

第1部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)3月2日

(51) Int.Cl.*	識別記号	序内整理番号	F I
C 12 M 1/00	A	9050-4B	
C 12 Q 1/68	A	9453-4B	
// C 12 Q 1/70		9453-4B	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全19頁)

(21)出願番号	特願平5-506805
(86) (22)出願日	平成4年(1992)10月5日
(85)翻訳文提出日	平成6年(1994)4月4日
(86)国際出願番号	PCT/NL92/00176
(87)国際公開番号	WO93/07292
(87)国際公開日	平成5年(1993)4月15日
(31)優先権主張番号	99647
(32)優先日	1991年10月4日
(33)優先権主張国	イスラエル(IL)
(31)優先権主張番号	102486
(32)優先日	1992年7月13日
(33)優先権主張国	イスラエル(IL)

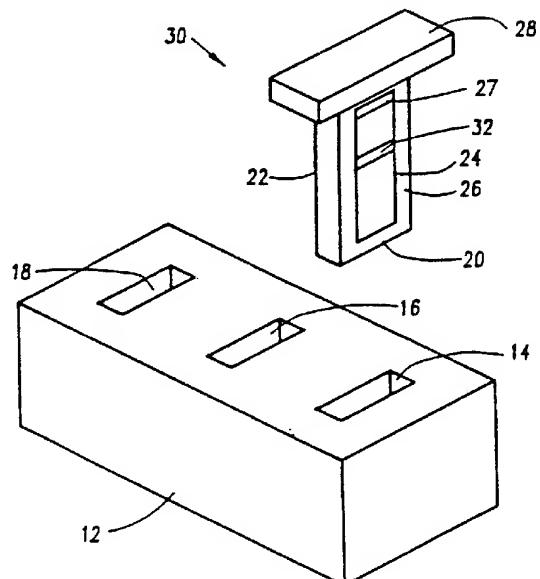
(71)出願人	オーゲニクス リミティド イスラエル国, ヤブネ 70650, インダストリアル ゾーン(番地なし), ピー.オ. ポックス 360
(72)発明者	レインハーツ, アブラハム イスラエル国, レホボット, シャチャーストリート 1
(72)発明者	アライエム, サラー イスラエル国, クファーハナジッド 64
(72)発明者	バペール, ティエリー フランス国, エフ-75008 パリ, アブニュ ダルトワ, 39
(74)代理人	弁理士 石田 敏 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 核酸配列の検出のための方法及び装置

## (57)【要約】

吸水性担体内で核酸配列を含む分子を輸送するための装置であって該分子を含む溶液と接触しているときに、該分子の輸送を補助するキャピラリー輸送経路を規定する乾燥吸水性担体を含んで成る装置。



## 請求の範囲

1. 吸水性担体内で核酸配列を含む分子を輸送するための装置であって、該分子を含む溶液と接触しているときに、該分子の輸送を補助するキャビラリー輸送経路を規定する乾燥吸水性担体を含んで成る装置。

2. 液体サンプル中の標的分子の濃縮のための装置であって：

乾燥吸水性担体（ここで、この標的分子は標的核酸配列を含み、そして前記吸水性担体内で、キャビラリー作用により、この乾燥吸水性担体がこの標的分子を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）；及び

前記吸水性担体の接触部分の下流にあるこの乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一捕獲試薬（ここで、この少なくとも一捕獲試薬は標的分子を捕獲することができる）；

を含んで成る請求項1に記載の装置。

3. 標的核酸配列を含む標的分子の、この標的分子と、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドとを含む液体サンプル中の非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドからの分離のための装置であって：

前記非標的オリゴヌクレオチドに結合する化合物を含む槽；及びキャビラリー作用により前記槽から前記標的分子を輸送するための手段；

を含んで成る装置。

4. 前記吸水性担体がニトロセルロース膜であり、ここでその吸収部位が前記標的分子のキャビラリー輸送を助長するためにブロックされている、請求項2に記載の装置。

17. 前記少なくとも一対のプライマーのうちの少なくとも第二プライマーが、少なくとも一捕獲試薬に結合するリガンドを抱えるオリゴヌクレオチドを含み、これにより、前記リガンドを抱える前記少なくとも一プライマーを含む前記標的分子が前記少なくとも一捕獲試薬に結合しうる、請求項14に記載の装置。

18. 前記リガンドが抗原性エピトープを含んで成る、請求項17に記載の装置。

19. 前記リガンドが少なくともースルホン化シトシンを含んで成る、請求項18に記載の装置。

20. 前記非標的オリゴヌクレオチドが、前記標的核酸配列に一体化されていないオリゴヌクレオチドプライマーを含んで成る、請求項3に記載の装置。

21. 前記化合物が、輸送のための前記手段によって輸送されるには大きすぎるゲル通過粒子を含んで成る、請求項3に記載の装置。

22. 前記化合物が、輸送のための前記手段によって輸送されないマトリックスを占めており、そしてここで前記化合物が前記非標的オリゴヌクレオチドとハイブリダイズする、請求項3に記載の装置。

23. 吸水性担体内での核酸配列を含む分子の輸送のための方法であって：

核酸配列を含む分子の輸送を補助するキャビラリー経路を規定する乾燥吸水性担体を用意し；そして

この乾燥吸水性担体を核酸配列を含む分子を含んでいる溶液と接触させること；

の段階を含んで成る方法。

24. 液体サンプル中の、核酸配列を含む分子の濃縮のための方法であって：

乾燥吸水性担体を用意し（ここで、前記分子は、標的核酸配列を

5. 前記吸水性担体が硬質枠により支持されている、請求項4に記載の装置。

6. 前記乾燥吸水性担体伝いの液体のキャビラリー輸送を助長するために、この吸水性担体に、前記少なくとも一捕獲ゾーンの下流にて吸収パッドが固定されている、請求項2に記載の装置。

7. ニトロセルロース膜の前記吸収部位が、巨大分子、清浄剤及びそれらの組合せを含んで成る群から選ばれる化合物によりブロックされている、請求項4に記載の装置。

8. 前記巨大分子がタンパク質を含む、請求項7に記載の装置。

9. 前記少なくとも一捕獲試薬が、前記標的核酸配列の改質部分に対する抗体を含んで成る、請求項2に記載の装置。

10. 前記少なくとも一捕獲試薬が、前記標的核酸配列の少なくとも一部に相補性な核酸プローブ配列を含む少なくとも一核酸捕獲試薬を含んで成る、請求項2に記載の装置。

11. 前記核酸プローブ配列がDNA配列を含む、請求項10に記載の装置。

12. 前記核酸プローブ配列がRNA配列を含む、請求項10に記載の装置。

13. 前記標的分子が30塩基対以上を含んで成る標的核酸配列を含む、請求項1に記載の装置。

14. 核酸配列を含む前記標的分子が、酵素增幅反応の核酸生成物を含んで成り、そして少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーを一体化せしめている、請求項2に記載の装置。

15. 前記少なくとも一対のプライマーがポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のためのプライマーを含んで成る、請求項14に記載の装置。

16. 前記少なくとも一対のプライマーがリガーゼ連鎖反応（LCR）のためのプライマーを含んで成る、請求項14に記載の装置。

含む標的分子であり、そしてここで、前記分子は、この吸水性担体内で、キャビラリー作用により、この乾燥吸水性担体の一部がこの分子を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）；

前記乾燥吸水性担体の一部を、前記標的分子を含む液体サンプルと接触させ（ここでこの乾燥吸水性担体は、濡れているとき、核酸配列を含む分子の輸送を補助する液輸送経路を規定する）；

前記液輸送経路伝いに前記標的分子を輸送し；そして

前記分子を、前記吸水性担体の前記液体と接触している部分の下流にあるこの乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一捕獲試薬により捕獲すること；

の段階を含んで成る方法。

25. 標的核酸配列を含む標的分子の、この標的分子と、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドとを含む液体サンプル中の非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドからの分離のための方法であって：

前記非標的オリゴヌクレオチドに結合する化合物を含む槽を用意し；

前記標的分子と、前記非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドとを含む液体サンプルを加え；そして

前記分子をキャビラリー作用により輸送すること；

の段階を含んで成る方法。

26. 標的核酸配列を含む標的分子の、この標的分子と、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドとを含む液体サンプル中の非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドからの分離、この標的分子の濃縮、並びに濃縮標的分子の検出のための装置であって：

前記非標的オリゴヌクレオチドに結合する化合物を含む複数ウェルの第一領域を含む複数のウェルを規定する機器品（ここで前記液

体サンプルをこの複数のウェルの第一領域に加えることができる) ; 濡れているときに前記標的分子の輸送を補助する、前記槽からの液輸送経路を規定する乾燥吸水性担体(ここで前記標的分子はこの吸水性担体内で、キャビラリー作用により、この乾燥吸水性担体の接触部分がこの標的分子を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される) ;

前記標的分子を捕獲できる少なくとも一捕獲試薬(ここでこの少なくとも一捕獲試薬は、この吸水性担体の接触部分の下流にあるこの乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている) ; 及び

この捕獲標的分子を検出するための手段 ;  
を含んで成る装置。

27. 液体サンプル中の標的核酸配列の濃縮及び検出のための方法であって :

乾燥吸水性担体を用意し(ここで、この標的核酸配列はこの乾燥担体内で、キャビラリー作用により、この乾燥吸水性担体の一部がこの標的核酸配列を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される) ;

前記乾燥吸水性担体の一部を、前記標的核酸配列を含む液体サンプルと接触させ(ここで、この吸水性担体は、濡れているとき、この標的核酸配列の輸送を補助する液輸送経路を規定する) ;

前記標的核酸配列を前記液輸送経路伝いに輸送し ;

前記標的核酸配列を、前記液体サンプルと接触しているこの吸水性担体の部分の下流にあるこの乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一核酸捕獲試薬とのハイブリダイゼーションにより捕獲すること ;

の段階を含んで成る方法。

32. 前記少なくとも一対のプライマーがポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のためのプライマーを含んで成る、請求項30に記載の装置。

33. 前記一対のプライマーが、リガーゼ連鎖反応(LCR)のためのプライマーを含んで成る、請求項30に記載の装置。

34. 前記少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーのうちの第二プライマーが、前記少なくとも一捕獲試薬に結合するリガンドを含み、これにより、このリガンドを含む前記標的分子がこの少なくとも一捕獲試薬に結合しうる、請求項30に記載の装置。

35. 前記リガンドが抗原性エピトープを含んで成る、請求項34に記載の装置。

36. 前記リガンドが少なくとも一スルホン化シトシンを含んで成る、請求項35に記載の装置。

37. 前記少なくとも一対のプライマーのうちの第一プライマーがシグナル生成試薬に結合するリガンドを含み、これにより、このリガンドを含む前記標的分子が、このシグナル生成試薬により生成されるシグナルの存在により検出されうる、請求項30に記載の装置。

38. 前記少なくとも一対のプライマーのうちの第一プライマーがシグナル生成試薬に結合するリガンドを含み、これにより、このリガンドを含む前記標的分子が、シグナル発生剤との接触後にこのシグナル生成試薬により生成されるシグナルの存在により検出されうる、請求項37に記載の装置。

39. 前記リガンドがビオチニル化ヌクレオチドを含んで成る、請求項37に記載の装置。

40. 前記シグナル生成試薬が着色ラテックスビーズに結合したストレプトアビシンを含んで成る、請求項37に記載の装置。

41. 前記シグナル発生剤との接触後に前記シグナル生成試薬により生成されるシグナルがストレプトアビシン-アルカリホスファタ

28. 標的核酸配列の濃縮及び検出のための装置であって: 複数のウェルを規定する槽備品 ;

濡れているときに前記標的核酸配列の輸送を補助する、前記槽からの液輸送経路を規定する乾燥吸水性担体(ここでこの標的核酸配列はこの吸水性担体内で、キャビラリー作用により、この乾燥吸水性担体の接触部分がこの標的核酸配列を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される) ;

ハイブリダイゼーションによって前記標的核酸配列を捕獲するための核酸プローブ配列を含む少なくとも一核酸捕獲試薬(ここで、この少なくとも一核酸捕獲試薬はこの吸水性担体の接触部分の下流にあるこの乾燥吸水性担体上の捕獲ゾーンにおいて固定化されている) ; 及び

前記の捕獲された標的核酸配列を検出するための手段 ;  
を含んで成る装置。

29. 検出のための前記手段が :

シグナル生成試薬に結合するリガンドを抱える、核酸配列を含む標的分子がその上に固定化されている吸水性担体 ; 及び  
この核酸配列を含む標的分子の検出を指標する検出可能シグナルを生成するため、前記リガンドを抱える核酸配列を含む標的分子を前記シグナル生成試薬と接触させるための手段 ;

を含んで成る、請求項26に記載の装置。

30. 前記標的核酸配列が酵素増幅反応の生成物であり、そして少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーを一体化せしめている、請求項29に記載の装置。

31. 前記非標的オリゴヌクレオチドが、前記標的核酸配列に一体化されていないオリゴヌクレオチドプライマーを含んで成る、請求項26に記載の装置。

ーゼコンジュゲートを含む、請求項38に記載の装置。

42. 前記した第一領域ウェルがシグナル生成試薬も含む、請求項26に記載の装置。

43. 前記複数のウェルが、洗浄溶液を含む第二領域ウェルを更に含む、請求項26に記載の装置。

44. 前記複数のウェルが、シグナル発生剤溶液を含む第三領域ウェルも含む、請求項26に記載の装置。

45. 前記複数のウェルが、標的核酸配列について検査すべきサンプルを含む第一領域ウェルを含んで成る、請求項28に記載の装置。

46. 前記複数のウェルが、シグナル生成試薬を含む第二領域ウェルを更に含んで成る、請求項28に記載の装置。

47. 前記複数のウェルが、洗浄溶液を含む第三領域ウェルを更に含んで成る、請求項28に記載の装置。

48. 前記複数のウェルが、シグナル発生剤を含む第四領域ウェルを更に含んで成る、請求項28に記載の装置。

49. 前記乾燥吸水性担体が少なくとも一本のストリップを含んで成る、請求項26に記載の装置。

50. 前記第一領域ウェルのそれぞれが、前記標的分子をそれらが捕獲される前記少なくとも一捕獲ゾーンに至るまで輸送するために、各ストリップの接触部分を受け入れるようになっている、請求項49に記載の装置。

51. 前記第二領域ウェルのそれぞれが、前記ストリップ-捕獲ゾーンにおける前記標的分子の固定化の後の非特異的に捕獲された化合物の除去のために、前記ストリップを洗浄するために各ストリップの接触部分を受容するようになっている、請求項43に記載の装置。

52. 前記第三領域ウェルのそれぞれが、ストリップ全体を受容するようになっている、請求項44に記載の装置。

## 53. 接触のための前記手段が：

シグナル生成試薬溶液を含む少なくとも一第三領域ウェル；  
前記少なくとも一捕獲ゾーンにおける前記標的分子の固定化を経た少なくとも一ストリップ（ここでこのストリップ全体がシグナル発生剤溶液と、このシグナル発生剤とこの少なくとも一捕獲ゾーンとの接触を可能とするように接触している）；

を含んで成る請求項52に記載の装置。

54. 前記第一領域ウェルそれぞれが、前記核酸配列を、それらが捕獲される少なくとも一捕獲ゾーンに至るまで輸送するよう各ストリップの接触部分を受容するようになっている、請求項28に記載の装置。

55. 前記第三領域ウェルそれぞれが、前記シグナル生成試薬を、それが前記標的核酸配列に抱えられたりガンドに結合する前記少なくとも一捕獲ゾーンに至るまで輸送するよう、各ストリップの接触部分を受容するようになっている、請求項46に記載の装置。

56. 前記第三領域ウェルそれぞれが、前記ストリップ一捕獲ゾーンにおける前記標的核酸配列の固定化の後の非特異的に捕獲された化合物の除去のために、前記ストリップを洗浄するために各ストリップの接触部分を受容するようになっている、請求項47に記載の装置。

## 57. 接触のための前記手段が：

シグナル生成試薬溶液を含む少なくとも一第四領域ウェル；

前記少なくとも一捕獲ゾーンにおける前記標的核酸配列の固定化を経た少なくとも一ストリップ（ここでこのストリップ全体がシグナル発生剤溶液と、このシグナル発生剤とこの少なくとも一捕獲ゾーンとの接触を可能とするように接触している）；

を含んで成る請求項48に記載の装置。

58. 前記第四領域ウェルがストリップ全体を受容するようになっている、請求項57に記載の装置。

## 59. 特異的な核酸配列の検出のための方法であって：

オリジナルの核酸配列の少なくとも一部に特異的である核酸配列を含む標的分子を生成するために、このオリジナル核酸配列の少なくとも一部を酵素反応によって増幅し；

この標的分子を、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドから分離し（ここで、この分離は：

非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドに結合する基体を含む槽を用意し；

前記標的分子と、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドとを含む液体サンプルを加え；そして

この標的分子をキャビラリー作用によって輸送する；段階を含む）；

この標的分子に濃縮し（ここで、この濃縮は：

乾燥吸水性担体を用意する（ここで、この標的分子はこの吸水性担体内で、キャビラリー作用により、この乾燥吸水性担体の一部がこの標的分子を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）；

この乾燥吸水性担体の一部を、この標的核酸配列を含む液体サンプルと接触させる（ここで、この乾燥吸水性担体は、濡れているとき、この標的分子の輸送を補助する液輸送経路を規定する）；

この標的分子をこの液輸送経路伝いに輸送し；そして

この標的分子を、この液体サンプルと接触している吸水性担体の部分の下流にあるこの乾燥吸水性担体上の捕獲ゾーンにおいて固定化去れている少なくとも一捕獲試薬により捕獲する；段階を含む）；次いで

この標的分子を、シグナル生成試薬を含み、且つ吸水性担体上に固定化されているリガンドを有する標的分子を、シグナル発生剤と

## 接触させて検出可能シグナルを生成することによって検出する；

段階を含んで成る方法。

## 60. 特異的な核酸配列の検出のための方法であって：

オリジナルの核酸配列の少なくとも一部に特異的である核酸配列を生成するために、このオリジナル核酸配列の少なくとも一部を酵素反応によって増幅し；

この標的核酸配列を含む液体サンプルを用意し；

この標的核酸配列をキャビラリー作用によって輸送し；

この標的核酸配列に濃縮し（ここで、この濃縮は：

乾燥吸水性担体を用意し（ここで、この標的核酸配列はこの吸水性担体内で、キャビラリー作用により、この乾燥吸水性担体の一部がこの標的核酸配列を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）；

この乾燥吸水性担体の一部を、この標的核酸配列を含む液体サンプルと接触させ（ここで、この乾燥吸水性担体は、濡れているとき、この標的核酸配列の輸送を補助する液輸送経路を規定する）；

この標的核酸配列をこの液輸送経路伝いに輸送し；そして

この標的核酸配列を、この液体サンプルと接触している吸水性担体の部分の下流にあるこの乾燥吸水性担体上の捕獲ゾーンにおいて固定化去れている少なくとも一捕獲試薬により捕獲する；段階を含む）；次いで

この標的核酸配列を、シグナル生成試薬を含み、且つ吸水性担体上に固定化されているリガンドを有する標的核酸配列を、シグナル発生剤と接触させて検出可能シグナルを生成することによって検出する；

段階を含んで成る方法。

## 明細書

## 核酸配列の検出のための方法及び装置

## 発明の分野

本発明はオリゴヌクレオチド及びヌクレオチドからの標的核酸配列を含む標的分子の分離、並びにこの分子の濃縮及び検出のための装置及び方法に関する。

## 発明の背景

標的核酸配列を含む標的分子の検出のための手順における增幅手順の利用は当業界に公知である。典型的には、この手順は標的核酸配列の酵素的增幅、及びゲル電気泳動、それに続くサザンプロット手順による標的分子の検出が含まれる。

数多くの固相捕獲アッセイも、核酸配列を含む標的分子の検出のための手順を簡素化するために開発されている。これらの手順においては、2種類のリガンドが一般に增幅標的核酸配列の中に一体化される。第一リガンドは、固相マトリックス上に、增幅標的核酸配列を含む標的分子を捕獲するために使用され、そして第二リガンドは、この第二リガンドへのシグナル生成試薬の結合によって標的分子を検出するために使用されている。

ところで、固相アフィニティー捕獲アッセイは反応混合物中の高比率の標的分子を捕獲するのに長い反応時間を必要とする（Sauvaigoら、Nucleic Acid Research, 1990, 第18巻, 頁3175-3182）。更に、捕獲が、固相アフィニティーリガンドを含む増幅プライマーにより仲介されるとき、このアッセイの感度は自由プライマーと標的核酸配列の中に一体化されたプライマーとの競合によって悪くなる

ことがある。

選別及び濃縮手順としてのクロマトグラフィーの利用は当業界に公知である。DNA分子は濡れた紙の上ではクロマトグラフィー的に移動するが、乾いた紙に溶液が付与されたときはそれらは泳動しないことが報告されている (Bendich ら、Arch Biochem Biophys., 1961, 94, 417-423)。

#### 発明の概要

本発明の第一の目的は、核酸配列を含む分子のキャビラリー（毛細管）輸送のための方法及び装置の提供にある。

本発明の別の目的は、液体サンプル中の標的核酸配列を含む標的分子の濃縮のための方法及び装置の提供にある。

本発明の更なる目的は、オクレオチド及びオリゴヌクレオチドからの、標的核酸配列を含む標的分子の分離のための方法及び装置の提供にある。

本発明の別の目的は、特異的な核酸配列を含む標的分子の検出のための方法の提供にある。

本発明に従い、吸水性担体中で核酸配列を含む分子を輸送するための装置が提供され、この担体は該分子を含む溶液と接触しているときに該分子の輸送を補助するキャビラリー輸送経路を規定する乾燥吸水性担体を含んで成る。

本発明の好ましい態様に従い、液体サンプル中の標的分子の濃縮のための装置が提供され、これは乾燥吸水性担体を含み、ここでその標的分子には標的核酸配列が含まれ、そしてそれはこの吸水性担体内で、キャビラリー作用により、この乾燥吸水性担体の一部がこの標的分子を含む液体サンプルと接触しているときに輸送され、そして少なくとも一捕獲試薬が、この吸水性担体の接触部分の下流に

ある乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されており、ここでこの少なくとも一捕獲試薬はこの標的分子を捕獲することが可能である。

また、本発明に従い、標的分子、と非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドとを含む液体サンプル中の非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドから、標的核酸配列を含む標的分子の分離のための装置を提供し、これは、この非標的オリゴヌクレオチドに結合する化合物を含む槽と、キャビラリー作用によってこの槽から標的分子を輸送するための器具とを含んで成る。

本発明の好ましい態様に従うと、この乾燥吸水性担体はニトロセルロース膜であり、ここでその吸収部位は標的分子のキャビラリー輸送を助長するためにブロックされている。

本発明の別の好ましい態様に従うと、この乾燥吸水性担体は硬質枠によって支持されている。

本発明の更に別の好ましい態様に従うと、この乾燥吸水性担体伝いの液体のキャビラリー輸送を助長するために、この吸水性担体に、その少なくとも一捕獲ゾーンの下流に、吸収パッドが固定されている。

本発明の更なる別の好ましい態様に従うと、このニトロセルロース膜の吸収部位は巨大分子、清浄剤及びそれらの組合せより成る群から選ばれる化合物によってブロックされている。

本発明の更なる別の好ましい態様に従うと、その巨大分子にはタンパク質が含まれる。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、この少なくとも一捕獲試薬にはこの標的核酸配列の改質領域に対する抗体が含まれる。

本発明の別の好ましい態様に従うと、この少なくとも一捕獲試薬は、この標的核酸配列の少なくとも一部に相補性な核酸プローブ配

列を含む少なくとも一核酸捕獲試薬を含んでいる。

本発明の更なる別の好ましい態様に従うと、この核酸プローブ配列はDNA配列を含む。

本発明の更なる別の好ましい態様に従うと、この核酸プローブ配列はRNA配列を含む。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、この標的分子は30以上の塩基対を含んで成る標的核酸配列を含む。

本発明の別の好ましい態様に従うと、この標的分子は、酵素増幅反応の核酸生成物を含み、そして少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーを含む核酸配列を一体化せしめる。

本発明の更なる別の好ましい態様に従うと、この少なくとも一対のプライマーはポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) のためのプライマーを含む。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、この少なくとも一対のプライマーはリガーゼ連鎖反応 (LCR) のためのプライマーを含む。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、この少なくとも一対のプライマーのうちの少なくとも第二プライマーは前記の少なくとも一捕獲試薬に結合するリガンドを抱えるオリゴヌクレオチドを含んでおり、これにより、このリガンドを抱える少なくとも一プライマーを含む標的分子はこの少なくとも一捕獲試薬に結合しうる。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、このリガンドは抗原性エピトープを含む少なくとも一捕獲試薬に結合する。

本発明の別の好ましい態様に従うと、少なくとも一捕獲試薬に結合するリガンドは少なくとも一スルホン化シトシンを含む。

本発明の更なる別の好ましい態様に従うと、この化合物はこの器具による輸送にとって大きすぎるゲル通過粒子を輸送のために含む。

本発明の更なる別の好ましい態様において、この非標的オリゴヌクレオチドは標的核酸配列に一体化していないオリゴヌクレオチドプライマーを含む。

本発明の更なる好ましい態様において、この化合物は輸送手段によって輸送されることのないマトリックスを含み、ここでその化合物は非標的オリゴヌクレオチドとハイブリダイズする。

本発明に従い、吸水性担体内で核酸配列を含む分子を輸送するための方法が提供され、これは、核酸配列を含む分子の輸送を補助するキャビラリー輸送経路を規定する乾燥吸水性担体を用意し、そしてこの乾燥吸水性担体を、核酸配列を含む分子を含んでいる溶液と接触させる段階を含む。

更に、本発明に従うと、液体サンプル中の、核酸配列を含む分子の濃縮のための方法が提供され、これは、乾燥吸水性担体を用意し（ここで、その分子は標的核酸配列を含む標的分子であり、そしてここでその分子は、この乾燥吸水性担体の一部をこの分子と含む液体サンプルと接触させたときに、キャビラリー作用によってこの吸水性担体内で輸送される）、この乾燥吸水性担体の一部を、標的分子を含む液体サンプルと接触させ（ここでこの乾燥吸水性担体は濡れているときに、核酸配列を含む分子の輸送を補助する液輸送経路を規定する）、その液輸送経路伝いにこの標的分子を輸送させ、そしてこの液体サンプルと接触している吸水性担体の部分の下流にあるこの乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一捕獲試薬によってこの標的分子を捕獲する、段階を含む。

本発明に従い、標的分子と、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドとを含む液体サンプル中の非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドから、標的核酸配列を含む標的分子の分離のための方

法が提供され、これは、この非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド配列に結合する化合物を含む槽を用意し、この標的分子と、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドとを含む液体サンプルを加え、そしてこの標的分子をキャビラリー作用によって輸送する段階を含む。

本発明に従うと、標的分子と、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドとを含む液体サンプル中のこの非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドからの、標的核酸配列を含む標的分子の分離、この標的分子の濃縮、並びにこの濃縮標的分子の検出のための装置も提供され、これは、この非標的オリゴヌクレオチドに結合する化合物を含む第1領域の複数のウェルを含む複数のウェルを規定する槽偏品（ここで、この液体サンプルはこの第一領域の複数のウェルに加えられる）、濡れているときに標的分子の輸送を補助する、この槽からの液輸送経路を規定する乾燥吸水性担体（ここで、この標的分子は、この中吸水性担体中で、キャビラリー作用により、この乾燥吸水性担体の一部が標的分子を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）、この標的分子を捕獲することのできる少なくとも一捕獲試薬（ここで、この少なくとも一捕獲試薬は、この吸水性担体の接触部分の下流にあるこの乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている）、及びこの捕獲標的分子を検出するための装置、を含む。

更に、本発明に従うと、液体サンプル中の、標的核酸配列の濃縮及び検出のための方法が更に提供され、これは、乾燥吸水性担体を用意し（ここで、この標的核酸配列は、この乾燥吸水性担体の一部をこの標的核酸配列を含む液体サンプルと接触させたときに、キャビラリー作用によってこの吸水性担体内で輸送される）、この乾燥吸水性担体の一部を、標的核酸配列を含む液体サンプルと接触させ

（ここでこの乾燥吸水性担体は濡れているときに、標的核酸配列の輸送を補助する液輸送経路を規定する）、その液輸送経路伝いにこの標的核酸配列を輸送させ、そしてこの液体サンプルと接触している吸水性担体の部分の下流にあるこの乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一核酸捕獲試薬とのハイブリダイゼーションによってこの標的核酸配列を捕獲する、段階を含む。

本発明に従い、標的核酸配列の濃縮及び検出のための装置が更に提供され、これは、複数のウェルを規定する槽偏品、濡れているとき標的分子の輸送を補助する、この槽からの液輸送経路を規定する乾燥吸水性担体（ここで、この標的核酸配列は、この吸水性担体内で、キャビラリー作用により、この乾燥吸水性担体の一部がこの標的核酸配列を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）、ハイブリダイゼーションによってこの標的核酸配列を捕獲するための核酸プローブ配列を含む少なくとも一核酸捕獲試薬（ここでこの少なくとも一核酸捕獲試薬は、この吸水性担体の接触部分の下流にあるこの乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている）、及びこの捕獲標的核酸配列を検出するための装置、を含む。

本発明の好ましい態様に従うと、検出のための装置は、シグナル生成試薬に結合するリガンドを抱える標的分子が固定化されている吸水性担体、及びこのリガンドを抱える標的分子をこの標的分子の検出を指標する高感度シグナルを生成するシグナル生成試薬と接触させるための装置を含む。

本発明の更に好ましい態様に従うと、検出のための装置は、シグナル生成試薬に結合するリガンドを抱える標的分子が固定化されている吸水性担体、及びこのリガンドを抱える標的分子を、この標的

分子の検出を指標する高感度シグナルを生成する発色剤と反応するシグナル生成試薬と接触させるための装置を含む。

本発明の別の好ましい態様に従うと、この標的核酸配列は酵素增幅反応の生成物を含み、そして少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーを含む。

本発明の更なる別の好ましい態様に従うと、この非標的オリゴヌクレオチドは、この標的核酸配列に一体化されていないオリゴヌクレオチドプライマーを含む。

本発明の更なる別の好ましい態様に従うと、その少なくとも2組のプライマーがポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のためのプライマーを含む。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、少なくとも一対のプライマーはリガーゼ連鎖反応（LCR）のためのプライマーを含む。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、この少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーのうちの少なくとも第二プライマーは少なくとも一捕獲試薬に結合するリガンドを含んでおり、これにより、このリガンドを含む標的分子はこの少なくとも一捕獲試薬に結合しうる。

本発明の別の好ましい態様に従うと、この少なくとも一捕獲試薬に結合するリガンドは少なくとも一スルホン化シトシンを含む。

本発明の更なる別の好ましい態様に従うと、この少なくとも一対のプライマーのうちの第一プライマーは、シグナル生成試薬に結合するリガンドを含み、これによりこのリガンドを含む標的分子は、シグナル生成試薬により生成されるシグナルの存在によって検出されうる。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、この少なくとも一対のプライマーのうちの第一プライマーは、シグナル生成試薬に結合する

リガンドを含み、これによりこのリガンドを含む標的分子は、シグナル発生剤と接触した後にこのシグナル生成試薬により生成されるシグナルの存在により検出されうる。

本発明の更なる別の好ましい態様に従うと、このシグナル生成試薬に結合するリガンドをビオチニル化ヌクレオチド配列を含む。本発明の更なる好ましい態様に従うと、このシグナル生成試薬は着色ラテックスビーズに結合したストレプトアビシンを含む。

本発明の別の好ましい態様に従うと、シグナル発生剤との接触後にこのシグナル生成試薬により生成されたシグナルはストレプトアビシン-アルカリホスホファーゼコンジュゲートを含む。

本発明の別の好ましい態様に従うと、この第一領域のウェルはシグナル生成試薬も含む。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、複数のウェルは更に、洗净溶液を含む第二領域のウェルを含む。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、複数のウェルはシグナル発生剤溶液を含む第三領域のウェルを含む。

本発明の別の好ましい態様に従うと、この乾燥吸水性担体は少なくとも一本のストリップを含む。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、複数のウェルは標的核酸配列について検査すべきサンプルを含む第一領域のウェルを含む。

本発明の別の好ましい態様に従うと、複数のウェルは更にシグナル生成試薬を含む第二領域のウェルを含む。

本発明の別の更なる好ましい態様に従うと、複数のウェルは更に洗净溶液の第三領域のウェルを含む。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、複数のウェルはシグナル発生剤を含む第四領域のウェルを含む。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、第一領域のウェルのそれ

それは、標的分子が、それらが捕獲される少なくとも一捕獲ゾーンに至るまで輸送されるよう、各ストリップの接触部分を受容するようになっている。

本発明の更に好ましい態様に従うと、この第二領域のウェルそれは、前記少なくとも一捕獲ゾーンにおける標的分子の固定化後の非特異的捕獲化合物を除去するのに前記ストリップを洗浄するため、各ストリップの接触部分を受容するようになっている。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、この第三領域のウェルはストリップ全体を受容するようになっている。

本発明の別の好ましい態様に従うと、前記接触のための装置は、シグナル生成試薬溶液を含む少なくとも一第三領域のウェル、及び前記少なくとも一捕獲ゾーンにおける標的核酸の固定化を経た少なくとも一ストリップを含み、ここでこのストリップ全体は、シグナル発生剤と少なくとも一捕獲ゾーンとの接触を可能とするようにシグナル発生剤溶液と接触している。

本発明の更なる別の好ましい態様に従うと、前記第一領域のウェルそれは、標的核酸配列が、それらが捕獲される少なくとも一捕獲ゾーンに至るまで輸送されるように、各ストリップの接触部分を受容するようになっている。

本発明の更なる別の好ましい態様に従うと、前記第二領域のウェルそれは、シグナル生成試薬が、それらが標的核酸配列上に抱えられたリガンドに結合する箇所である少なくとも一捕獲ゾーンに至るまで輸送されるように、各ストリップの接触部分を受容するようになっている。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、前記第三領域のウェルそれは、少なくとも一捕獲ゾーンにおける標的核酸配列の固定化後に非特異的捕獲化合物を除去するのにこのストリップを洗浄する

ため、各ストリップの接触部分を受容するようになっている。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、前記接触のための装置は、シグナル発生剤を含む少なくとも一第四領域のウェル、及び前記少なくとも一捕獲ゾーンにおける標的核酸配列の固定化を経た少なくとも一ストリップを含み、ここでこのストリップ全体は、シグナル発生剤と少なくとも一捕獲ゾーンとの接触を可能とするようにシグナル発生剤溶液と接触している。

本発明の更なる好ましい態様に従うと、この第四領域のウェルそれはストリップ全体を受容するようになっている。

本発明に従い、特異的な核酸配列の検出のための方法も提供され、この方法は、オリジナルの核酸配列の少なくとも一部に特異的である核酸配列を含む標的分子を生成するために、このオリジナルの核酸配列の少なくとも一部を酵素反応により増幅させ、この標的分子を非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドから分離し（この分離は、この非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドに結合する基体を含む槽を用意し、標的分子と、この非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドとを含む液体サンプルを加え、次いでキャビラリー作用によってこの標的分子を輸送する段階を含む）、この標的分子を濃縮し（この濃縮は、乾燥吸水性担体を用意し（ここで、標的分子は、この吸水性担体内で、キャビラリー作用により、この乾燥吸水性担体の一部が標的分子を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）、この乾燥吸水性担体の一部を、標的核酸配列を含む液体サンプルと接触させ（ここでこの乾燥吸水性担体は、漏れているとき、この標的分子の輸送を補助する液輸送経路を規定する）、この標的分子をこの液輸送経路伝いに輸送し、次いでこの標的分子を、液体サンプルと接触している吸水性担体の部の下流にある乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化され

ている少なくとも一捕獲試薬によって捕獲する段階を含む）、次いで、シグナル生成試薬と結合するものであって吸水性担体上に固定化されているリガンドを有する標的分子を、シグナル生成試薬と接触させて検出可能なシグナルを生成することによりこの標的分子を検出する、段階を含む。

本発明に従って特異的な核酸配列の検出のための方法が更に提供され、この方法は、オリジナルの核酸配列の少なくとも一部に特異的である標的核酸配列を生成するためにオリジナルの核酸配列の少なくとも一部を酵素反応により増幅させ、この標的核酸配列を含む液体サンプルを用意し、この標的核酸配列をキャビラリー作用により輸送し、この標的核酸配列を濃縮し（この濃縮は、乾燥吸水性担体を用意し（ここで、この標的核酸配列はこの吸水性担体内で、キャビラリー作用によって、この乾燥吸水性担体の一部がこの標的核酸配列を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）、この乾燥吸水性担体の一部をこの標的核酸配列を含む液体サンプルと接触させ（ここで、この乾燥吸水性担体は、漏れているとき、この標的核酸配列の輸送を補助する液輸送経路を規定する）、次いでこの標的核酸配列をこの液輸送経路伝いに輸送する段階を含む）、この標的核酸配列を、液体サンプルと接触している吸水性担体の部分の下流にあるこの乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一核酸捕獲試薬によって捕獲し、次いでこの標的核酸配列を、シグナル生成試薬に結合するものであって吸水性担体上に固定化されているリガンドを有する標的核酸配列をシグナル発生剤と接触させて検出可能なシグナルを生成することによって検出する段階を含んで成る。

#### 図面の簡単な説明

本発明は図面と関連付けた下記の詳細な説明からより完全に理解及び知得されるものであり、ここで：

図1は、液体サンプル中の非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドからの標的核酸配列の分離、標的核酸配列の濃縮、並びに濃縮標的核酸配列の検出のための、本発明に従って構築され、且つ使用される、使用前の装置の前面図であり；

図2は、使用中の図1の装置の前面図であり；

図3は、使用前の図1の装置とは別の態様の前面図であり；そして

図4は、使用中の図3の装置の前面図である。

#### 好ましい態様の詳細な説明

図1～4について参照されたいが、これは本発明の好ましい態様に従って構築され、且つ使用される、液体サンプル中の非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドからの標的核酸配列を含む標的分子の分離、標的分子の濃縮、並びに濃縮標的分子の後出のための装置10を示している。

装置10は、非孔性材料、例えばポリスチレンより組立てられ、且つ複数のウェル、例えばウェル14、16及び18を含む槽備品12を含む。これらのウェル、例えばウェル14、16及び18はおよそ、長さ1cm、幅0.5cm、そして深さ2.5cmであり、そしてストリップ20の接触部分20を受容するようなサイズである。

このストリップ22は、ほぼ長さ3.0cm及び幅0.5cmであり、且つ3～5ミクロンの孔径を有するマイレレッド(mylared)ニトロセルロース膜において典型的に具現化された吸水性担体24を含み、これは補強枠26によって囲まれていてよい。この補強枠26は非孔性材料、

例えばポリスチレンより組立てられ、そして吸水性担体24はこの枠22に接着剤のような常用の手段によって接着されていてよい。ほぼ長さ2cm、幅0.5cmの、吸収材料、例えばWhatman 3MMペーパー(Whatman, Maidstone, U. Kより入手可)より成る吸収パッド27が、接着剤のような常用の手段によって接触部分20と対立するこのストリップの先端に取付けられている。このストリップ22の先端には、接着剤のような常用の手段によってとっ手28も取付けられている。このとっ手28は非孔性材料、例えばポリスチレンより成る。少なくとも1ストリップ22がとっ手28に取付けられて、検査部材30を構成している。

単独の捕獲試薬が一般に、吸水性担体24の上にその吸水性担体の中心領域において固定化されて、捕獲ゾーン32を形成している。単独の捕獲試薬が一般に利用されるが、単独の吸水性担体上に多重捕獲ゾーンを形成するように複数の捕獲試薬が利用されてよい。

単独捕獲試薬、典型的には抗ースルホン化DNA抗体、又は標的核酸配列の少なくとも一部に相補性である核酸は、ニトロセルロース脱上への吸収によって典型的に固定化されている。

ウェル14は典型的には酵素反応混合物を含む。更に、この捕獲試薬が抗ースルホン化DNA抗体のとき、ウェル14は典型的にはゲル通過粒子(図示せず)、典型的にはSephadex G-100(Pharmacia, Uppsala, Sweden)ゲル通過粒子を含む。このゲル通過粒子は吸水性担体24の中でキャビラリー作用によって輸送されるには大きすぎるサイズである。

装置10を利用して特異的な核酸配列を検出するために利用する手順は典型的には、少なくとも1対のプライマーを利用するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)又はリガーゼ連鎖反応(LCR)を利用した特異的核酸配列の酵素増幅を含む。これらの反応の少なくとも1対のプライ

マーのうちの少なくとも第一プライマーは、アフィニティーリガンド、典型的にはシグナル生成試薬に結合するビオチン、典型的にはストレプトアビジンアルカリホスファターゼコンジュゲートを抱える。更に、捕獲試薬が抗ースルホン化DNA抗体であるとき、酵素増幅のための少なくとも1対のプライマーのうちの少なくとも第一プライマーは、アフィニティーリガンド、典型的にはスルホン化シトシンを抱えており、これは捕獲ゾーン22の捕獲試薬に結合している。数回の増幅サイクル、典型的には1~50サイクルを経て、反応混合物のアリコートを装置10を利用してアッセイする。

捕獲試薬が抗ースルホン化DNA抗体であるとき、標的核酸配列、オリゴヌクレオチドプライマー及びヌクレオチドを含む反応混合物のアリコート、典型的には1~20μlをウェル14に加える。シグナル生成試薬を含む溶液、典型的にはTPGランニングバッファー(0.3%のツイーン20及び1%のゼラチン; PBS中)中のストレプトアビジンアルカリホスファターゼコンジュゲート約30μlもウェル14に加え、次いでストリップ22の接触部分20を反応混合物と接触させてウェル14の中に入れた。核酸配列を含む標的分子を含んでいるこの反応混合物をキャビラリー輸送によって吸水性担体24に、捕獲ゾーン32を経て(ここで標的分子は捕獲試薬により捕獲される)吸収パッド27へと搬送させる。

約10分後、ラベル化核酸配列を含む分子のほとんど(典型的にはラベル化分子のうちの80%以上)が捕獲ゾーンの中に捕獲された。次にストリップ22の接触部分20をウェル14から除去し、そしてウェル16の中に入れた。

ウェル16は典型的には約50μlのTPバッファー(PBS中の0.3%のツイーン)を含み、これは吸水性担体24に捕獲ゾーンへと搬送され、標的核酸配列の検出を妨害しうる非特異的捕獲化合物を除

去する。約10分後、ストリップ22をウェル16から取り出し、そしてウェル18に浸した。

ウェル18は約300μlのシグナル発生剤溶液、典型的には発色基質(BCIP/NBT, Orogenics Ltd., Yavne Israelより市販)を含むChemiprobe(商標)溶液を含む。この溶液が捕獲ゾーン32を覆っている。シグナル生成試薬、即ちこの捕獲ゾーン32中のラベル化分子に付加しているアルカリホスファターゼは、この発色基質を、標的核酸配列の検出を指標する検出可能シグナルである沈殿性色素へと変換せしめる。

捕獲試薬が、標的核酸配列の少なくとも一部に相補性な核酸であるとき、この反応混合物のアリコートを典型的には0.6MのNaCl, 20mMのリン酸バッファー、pH7.5, 0.02%のフィコール400(Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.02%のゼラチン及び1%PVPより成るハイブリダイゼーション溶液で希釈する。次にこのサンプルを典型的には煮沸し、次いで急冷し、そして各溶液のアリコートを装置12のウェル14に移す。各ストリップ22の接触部分20を次にウェル14中の溶液と典型的には接触させる。

次に装置10を典型的には多湿インキュベーターの中に約25分入れておき、そして吸水性担体24を形成しているニトロセルロースストリップ22にこの溶液を泳動させる。核酸配列を含む標的分子を含む溶液を吸水性担体24に、キャビラリー輸送によって、吸収パッド27へと搬送し、そして捕獲ゾーン32を通過させ、ここで標的分子はこの標的核酸配列に相補性の核酸によって捕獲される。

ストリップ22を次に典型的にはストレプトアビジンアルカリホスファターゼコンジュゲートを含むウェル16に移す。次にストリップ22を典型的にはPBS中の0.3%のツイーン20 150μlを含む溶液を含んでいるウェル18に移し、そしてストリップ22の接触部分20をこ

の溶液に約15分接触させておいた。

最後に、ストリップ22を図面には示していない一連のウェル中の、発色反応のための基質を供するChemiPrope(商標)BCIP/NBT溶液の中に約20分浸した。ストリップ22の捕獲ゾーン32における青色シグナルは標的分子の存在を示唆している。

図3及び4においてわかる通り、一より多くのストリップ22をとっ手28に取付けて、複数のアッセイを同時に行うを可能とすることができる。

実施例を、本発明を例示する図1~4と共に下記に説明する。

#### 実施例1

##### ニトロセルロース上での輸送及び濃縮

###### a) プライマーの配列合成及びラベリング

HIV-1の遺伝子におけるプライマーを選び、そして下記の配列を有していた:

プライマー 3

5' TGGGAAGTCAATTAGGAATACCA

プライマー 4

5' CCTACATACAAATCATCCATGTATTC

これらのプライマーをApplied Biosystems 380A DNAシンセサイザー(Applied Biosystems, Hayward, CA, USA)で合成し、そしてOPC迅速精製カートリッジ(Applied Biosystems, CA, USA)を用いて精製した。

#### プライマーのスルホン化

プライマー3'を5'末端において、13量体ポリシトシンテールによって合成した。これらのプライマーを次にChemiProbe(商標)キット(Orogenics Ltd.より市販)に記載のプロトコールに従って

スルホン化した。

100  $\mu$  l の C テールプライマー (0.5 mg/ml) を ChemiProbe (商標) キットの溶液 A (4 M の亜硫酸水素ナトリウム) 50  $\mu$  l 及び ChemiProbe (商標) キットの溶液 B (1 M) のメトキシアミン) 12.5  $\mu$  l と混ぜ、そして 20°C で一夜インキュベートした。次にスルホン化オリゴヌクレオチドを 2  $\mu$  l のベッドの Sephadex G-50 スピンカラムを通じる遠心により脱塩した。

#### プライマービオチニル化

プライマー 4 を 5' 末端において、4 個のシトシンヌクレオチドが N' - LCA - 5' - メチルデオキシチジン (American Bionetics, Hayward, CA, USA) により置き代って CccCccCccCcc (ここで C は改質シトシンを表わす) となっている 12 量体ポリシトシンによって合成した。これらのオリゴヌクレオチドを、その教示内容を引用することで本明細書に組入れる Maniatis, T. ら、Molecular cloning: a laboratory manual, 1989, p646, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. に記載の手順に従ってアクリルアミドゲルにより精製した。

精製したオリゴヌクレオチドを下記の手順に従ってビオチニル化した：

10nmole のデシケートに付したプライマーを 50  $\mu$  l の 100 mM のホウ酸バッファーの中に溶かし、そして 0.1 mg のビオチン N ヒドロキシスクシニミド (Pierce, Rockford, ILL, USA) 0.1 mg を含む 50  $\mu$  l のジメチルホルムアミド (DMF) に加えた。この溶液を次に 20°C で一夜インキュベートし、次いで Nensorb 20 カラム (Du Pont Company, Wilmington, DE, USA) を通じて、その供給者の仕様に従って精製した。このプライマーを次にエバボレーションにより濃縮し、そしてもとの温度となるように水に再懸濁した。

を構成する。リン酸緩衝食塩水 (PBS) 中の 1 % のスクロースの添加された、Organics Ltd. より市販の精製マウスモノクローナル抗一抗改質化 DNA (カタログ no. 10793010) (2 mg/ml) 1  $\mu$  l を、ニトロセルロースストリップの中央に水平線において包埋して捕獲ゾーン 32 を形成した。このストリップを次に 37°C で 1 時間風乾した。

次に自由な吸収部位を、PBS 中の 1 % のゼラチン (Norland Products Inc., New Brunswick Canada) 及び 0.05 % のツイーン 20 (Sigma) の溶液の中に 2 時間このストリップをインキュベートすることによってブロックした。このニトロセルロースストリップを次に水中で簡単に洗い、37°C のインキュベーターの中で 1 時間乾かし、そしてデシケートのもとで少なくとも 4 ヶ月間保管した。吸収パッド 27 として働くよう、0.5 × 2 cm の四角い Whatman 3MM ベーパーをこのストリップの上面に取付けた。

2. ブロッキング工程抜きで上記の通りにマイレッド ニトロセルロース片を用意した。

#### d) DNA の輸送及び濃縮

PCR 反応混合物を TGP ランニングバッファー (PBS 中の 0.30 % のツイーン 20 及び 1 % のゼラチン) 又は PBS のいづれかに 10 倍に希釈した。次に 30  $\mu$  l づつの各溶液を、図 1 ~ 4 に示す装置のウェルと似たウェルに移し、そして各ストリップ 22 の接触部分 20 をこの溶液と接触させた。

この溶液を、吸水性担体 24 を構成するニトロセルロースストリップ伝いに室温で 10 分泳動させた。次にこのストリップに、1 : 2,500 に希釈したストレプトアビジンアルカリホスファターゼコンジュゲート (Enzymatix, Cambridge, U. K.) の溶液を完全に覆った。室温で 10 分のインキュベーションの後、このストリップを水で簡単に洗い、次いで BCIP/NBT ChemiProbe (商標) 溶液 (Organics Ltd.) によ

b) HIV 配列の増幅 陽性 HIV サンプル由来の抽出 DNA 1  $\mu$  g を含む 100  $\mu$  l の混合物 (抽出手順は、その教示内容を引用することで本明細書に組入れる Edwards ら、The Journal of Pediatrics, 1989, 第 45 卷、頁 200-203 に従う)。100 pmole づつのプライマー P3 及び P4, 0.25 mM の 4 種のデオキシヌクレオチド三リ核酸 (dNTP)、10  $\mu$  l の 10X の Taq バッファー (Promega, Madison, Wisconsin, USA) 並びに 2.5 U の Taq ポリメラーゼ (Promega) を、プログラム可能 Grant (Cambridge, U. K.) 浴槽で下記の条件のもとで増幅した。

94°C で 5 分の第一 DNA 変性段階に、94°C での 1 分の変性、52°C での 1 分の DNA アニーリング及び 72°C で 1 分の DNA 伸長の 30 サイクルを続いた。増幅は 72°C で 7 分間の伸長段階で終えた。

第二増幅は、第一増幅と同じ条件だが、前述のラベル化ビオチニル化及びスルホン化プライマーを利用して 20 サイクルにわたって行なった。使用した DNA 鑄型は、100 pmole づつの各ラベル化プライマー、0.25 mM の 4 種のデオキシヌクレオチド三リ核酸、10  $\mu$  l の 10X の Taq バッファー (Promega) 及び 2.5 U の Taq ポリメラーゼ (Promega) を含む 100  $\mu$  l の混合物の中に希釈した第一 PCR 混合物 1  $\mu$  l とした。プライマーを PCR 生成物から、反応混合物 100  $\mu$  l を 2.5 M の NaCl 溶液中のポリエチレンギリコール (PEG) (Sigma, St. Louis MO, USA) 60  $\mu$  l と混合することにより排除した。この混合物を次に 4°C で 1 時間インキュベートした。次に、4°C で 10,000 ×g での 10 分間の遠心の後、上清液を捨て、そしてそのペレットを 100  $\mu$  l の水に再懸濁した。

#### c) ニトロセルロース支持ストリップの製造

1. マイレッド ニトロセルロース (孔径 3  $\mu$ ) (Schleicher & Schuell, Dussel, Germany) を 0.5 × 3.0 cm の長に切り、図 1 ~ 4 の装置の吸水性担体 24 を行った。この吸水性担体 24 はストリップ 22

に覆った。5 分後、このストリップを水で簡単に洗い、そして目視に付した。色素はエタノールの中での簡単な洗浄及び室温での乾燥により安定にした。その捕獲ゾーンに紫の線分が認められたらストリップ 22 は HIV について陽性であると考えた。

バッファーとして PBS を用いてのニトロセルロースストリップの吸収部位をブロックしていないニトロセルロースストリップ上の PCR 増幅 HIV 生成物の泳動は陽性反応を示すことがなかった。しかしながら、ニトロセルロースの自由吸収部位がゼラチン溶液によってブロックされているストリップ 22 は、ランニングバッファーとして PBS を用いたときに可視シグナルを提供した。更に、PCR 反応混合物溶液との接触に付する前に吸収部位をブロックしていないストリップ 22 は、TGP ランニングバッファーを使用したときに可視シグナルを提供した。最も強いシグナルは、ブロックストリップ及び TGP ランニングバッファーの両方を使用したときに得られた。

これらの結果は、増幅核酸配列がキャビラリー移動により、ニトロセルロースの吸収部位が核酸配列のキャビラリー輸送の前又は最中のいづれかにおいてブロックされているニトロセルロースストリップ伝いに泳動できることを示唆している。更に、これらの結果は、溶液中の増幅 DNA が、ブロック化ニトロセルロースストリップを接触点において増幅 DNA を含む溶液と接触させ、次いでこの増幅 DNA をその接触点の下流にあるこのニトロセルロースストリップ上の適当な捕獲部位において捕獲することにより濃縮されることも示唆している。

#### 実施例 2

ニトロセルロース上でゲノム及びプラスミド DNA の輸送及び濃縮 ヒト胎盤 DNA (Sigma), CasKi 細胞 DNA 及びブルースクリプト プラスミド DNA を用意し、そして Nur ら (Ann. Biol. Clin., 1989,

47, 601-606)に記載の通りにスルホン化し、ここでCasKi 細胞DNA 又はヒト胎盤DNA の各分子は約 $10^{11}$  基対を有している。HIV 特異的PCR 生成物を増幅し、ここで一方のプライマーはスルホン化し、他方のプライマーはビオチニル化し、これによって実施例1に記載の通りPCR 生成物を二重ラベルに付した。ブロック吸収部位を有するニトロセルロースストリップ22も実施例1に記載の通りに用意した。

3種類のDNA のそれぞれの $20\mu\text{g}/\text{ml}$ の溶液(スルホン化又は未スルホン化) $1\mu\text{l}$ を $20\mu\text{l}$ のTGP ランニングバッファーに加えた。このDNA 溶液をウェルに入れ、そしてこのストリップ22の接触部分をこの溶液と接触させた。10分後、このストリップをDNA 溶液から取出し、そして別のウェルに移し、ここでそのストリップ22の接触部分20を、二重ラベルPCR 生成物(実施例1のHIV PCR 反応混合溶液から $1:20$ に希釈)及びTGP ランニングバッファーに $1:2,500$ に希釈したストレプトアビジンアルカリホスファターゼコンジュゲート(Enzymatix, Cambridge, U. K.)と接触させた。二重ラベルDNA 生成物との10分の接触の後、ストリップ22を10分間、このストリップ22の接触部分をTGP バッファーの洗浄溶液と接触させることにより洗った。最後に、このストリップ22をChemiProbe(商標) BCIP/NBT溶液(Organic Ltd.より市販)の中に、実施例1に記載の通り5分のインキュベーション時間浸しておいた。

3種類のDNA 、即ち、胎盤DNA, CasKi細胞DNA 及びブルースクリプトプラスミドDNA の全てが、完全にスルホン化されているとき、捕獲ゾーン32中の可視シグナルの発生を防ぐことが見い出された。これらの結果と対照的に、同一のDNA を含むが、そのDNA がスルホン化されていない溶液はシグナルを阻止することができなかった。これらの結果は、ゲノムDNA 及びプラスミドDNA の両者が、液体の

キャビラリー移動によってニトロセルロース担体伝いに輸送されうこと、並びにこのDNA がニトロセルロースストリップ上の適当な捕獲部位にて濃縮されうることを示唆している。

上記の結果は、サンプル中の標的DNA の存在が、標的DNA がスルホン化され、且つ前述の通り二重ラベルDNA を捕獲する前に捕獲ゾーンに結合されているとき、二重ラベルPCR 生成物により生成されるシグナルの低下によって検出されうることも示唆している。

### 実施例3

#### 検出系の比較

HPV のE6遺伝子におけるプライマーを選び、これはその教示内容を引用することで本明細書に組入れるイスラエル特許出願第097226号に記載のHPV16, HPV18及びHPV33 の共通プライマーである。それらのプライマーは下記の配列を有する:

プライマー h15' AAGGGAGTAACCGAAATCGGT

プライマー h25' ATAATGTCTATATTCACTAATT

プライマー合成及びラベル手順は実施例1に記載の通りである。これらの手順に従ってプライマーh1はスルホン化し、そしてプライマーh2はビオチニル化した。

#### HPV DNA 配列の増幅及びラベリング

100 pmole のラベル化又は未ラベルプライマー、HybriComb(商標) HPキット(Organic Ltd.より市販)の仕様書に従って頸部生検から抽出した $1\mu\text{g}$ のDNA, 0.25mM のデオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP),  $10\mu\text{l}$ の $10X$ のTaq バッファー(Promega より市販)及び2.5単位のTaq ポリメラーゼ(Promega より市販)を含む $100\mu\text{l}$ の反応混合物。この混合物のサーモサイクリングをGrant プログラム可能浴槽で実施した。

未ラベルプライマーを用いて第一PCR 段階を実施した。各増幅サ

イクルは: 94°Cで1分のDNA 変性、55°Cで1分のアニーニング段階、及び72°Cで1分のDNA 伸長段階より成る。増幅反応は20サイクルを経て、72°Cでの5分間の伸長に終結させた。ラベル化プライマーを利用する第二PCR 段階を下記の手順に従って実施した。 $1\mu\text{l}$ の第一反応混合物を、第一PCR 反応のそれと同一の反応混合物(ただし、非ラベルプライマーではなく、ラベル化されたもの) $100\mu\text{l}$ の含む6レプリケートそれぞれに加えた。各レプリケートを0, 10, 20, 25又は30サイクルにわたって増幅し、次いで4°Cで保存した。

#### PCR 生成物の検出

##### 1. 奥化エチジウム-EtdBr による検出。

増幅後、 $10\mu\text{l}$ のPCR 混合物を8%の未変性(TEA)トリス-酢酸バッファー-ポリアクリラミドゲル上で電気泳動し、そして50mAで1時間電気泳動にかけた。ゲルを $10\mu\text{g}/\text{l}$ の奥化エチジウム(EtdBr)の中に15分浸し、そしてDNA をUV光により目視した。

##### 2. サザンプロットによる検出。

電気泳動による分離後、泳動したPCR フラグメントを、トランスプロットセル(Bio-Rad, Richmond, CA, USA)の中で1.5Ampにて3時間にわたり、トランスファーバッファーとしてTAE バッファーを利用して、Hybond-N膜(Amersham, Bucks, U. K.より市販)上にエレクトロプロットした。この膜を風乾し、次いで80°Cで2時間焼いた。

ビオチニル化ラベルの目視は下記の通りに実施した: 膜を、1-light(Tropix, MA, USA)及び0.1%のツイーン20の添加されたPBS によりブロックした。このナイロン膜を、 $1:2,500$ に希釈したストレプトアビジンアルカリホスファターゼコンジュゲートの添加された同一のブロッカーの中で1時間インキュベートし、その後PBS の中の0.1%のツイーン20を含む溶液により洗った。最後に、

この膜をChemiProbe(商標) BCIP/NBT発色溶液の中に30分浸し、そして過剰の発色物を水ですすいだ。

#### 3. 固相支持体捕獲(ディップスティック)アッセイによる検出。

ディップスティック捕獲アッセイのための固相支持体として非吸水性インパクトポリスチレン(Organic Ltd.より市販)を使用した。ディップスティックの製造。PBS 中の $2\text{mg}/\text{ml}$ の精製マウスモノクローナル抗一抗改質化DNA の溶液 $1\mu\text{l}$ をディップスティックの下部に適用し、次いで37°Cで1時間乾かした。その未結合の部位も、このディップスティックを1%のゼラチン及び0.05%のツイーン20の溶液の中に1時間浸すことによってブロックした。このディップスティックを次に水の中で2~5秒間洗い、そして37°Cで1時間乾かした。

#### アッセイ:

第二PCR サイクルグループそれぞれに由来する $5\mu\text{l}$ の反応混合溶液を、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼコンジュゲートを含む $45\mu\text{l}$ のTGP ランニングバッファーに加えた(1:200)。この溶液をウェルに入れ、次いでこのディップスティックをこの溶液の中に浸した。30分のインキュベーション後、このディップスティックをPBS の中に洗い、そしてBCIP/NBT溶液の中に20分浸した。反応はこのディップスティックを水で洗うことにより停止させた。

#### 4. キャビラリーDNA 濃縮アッセイ(CDCA)による検出。

第二PCR サイクルグループそれぞれに由来する各反応混合溶液 $3\mu\text{l}$ を、TGP ランニングバッファーの中に $1:2,500$ に希釈されたストレプトアビジンアルカリホスファターゼコンジュゲートを含む溶液 $30\mu\text{l}$ を含んでいるウェルに加えた。実施例1の通りにニトロセルロースストリップを調製した。ストリップ22の接触部分20をこのウェルの中の溶液と10分間接触させた。このストリップ20の接触

## 特表平7-501933 (11)

部分を次に50  $\mu$ l の洗浄溶液 (TPバッファー) を含むウェルに10分間接触させておいた。最後に、このストリップ22を、発色反応のための基質を供するChemiProbe (商標) BCIP/NBT溶液の中に5分間完全に浸しておいた。

上記の手順の結果を表1に示し、これらは、前述のアッセイ-EtdBr, サザンプロット、固相支持体捕獲アッセイ及びCDCAについてのPCRサイクル数に関する検出限界を示す。

表 1  
いくつかの系の検出限界

System	PCR サイクル数					
	0	10	15	20	25	30
Etd/br	—	—	±	+	+	+
サザンプロット	—	±	+	+	+	+
ディップスティック	—	—	±	+	+	+
CDCA	—	+	+	+	+	+

± = 域値レベル

— = 絶対陰性

+= 絶対陽性

表1からわかる通り、ディップスティック検査の感度はEtdBr蛍光検査のそれと似ており、両者ともサザンプロット技術より感度が低かった。CDCAはサザンプロット技術と少なくとも同程度の感度であることが認められた。

#### 実施例4

##### CDCA手順の感度に及ぼす増幅後のプライマー排除の効果

特異的なHIV配列を陽性HIVサンプルから、100  $\mu$ l の反応混合

物中の実施例1に記載の未ラベルプライマー3及びプライマー100 pmoleを用いる20PCRサイクルにより増幅させた。第二増幅は第一増幅と同じ条件で実施したが、ただしラベル化プライマーを用いて、そして2, 4, 6, 8, 10及び20サイクルに付した。第二PCR増幅のための錠型は、100 pmoleの各ラベル化プライマー、0.25mMの4種類のデオキシヌクレオチド三リン酸、10  $\mu$ l の10XのTaqバッファー (Promega)及び2.5 UのTaqポリメラーゼ (Promega)を含む反応混合物100  $\mu$ l に希釈した第一PCR混合物1  $\mu$ lとした。各PCR増幅サイクル数について、4アリコートの100  $\mu$ l のPCR反応混合物を各アッセイについて検査した。

アッセイ1。

第一アッセイは実施例3に記載のCDCA系とした。各PCR増幅サイクル数のグループからの3  $\mu$ l の反応混合物を、TGPランニングバッファー中の30  $\mu$ l のストレプトアビシンアルカリホスファターゼを含むウェルに加え、そしてCDCAを実施例3に記載の通りに実施した。

アッセイ2。

第二アッセイにおいて、PCR反応混合物をPEGで処理してCDCAを実施する前にプライマーを除去した。各PCR増幅サイクル数のグループのプライマーは実施例1に記載の通りにPEG溶液を利用して排除した。3  $\mu$ l のPEG処理PCR増幅混合物を30  $\mu$ l のTGPランニングバッファーに加え、次いでアッセイを実施例3の通りに実施した。アッセイ3。

第三アッセイにおいては、PCR反応混合物中のプライマーはCDCAの前にSephadex G-100により排除した。各PCR増幅サイクル数のグループのプライマーをSephadex G-100により下記の通りに排除した。Sephadex G-100 (Pharmacia)中の0.5  $\mu$ l のトリスEDTバッファー

(TE)をウェルに移し、過剰のTEを滤紙で吸収した。15  $\mu$ l の各PCR反応混合物をTGPランニングバッファーで1:1に希釈し、そしてこの混合物をウェルの底に直接載せた。

実施例1に記載の通りに用意した。吸収部位がブロックされているニトロセルロースストリップを含むストリップ22の接触部分20を、Sephadex G-100の上側と25分接触させた。このストリップ22の接触部分を次にウェル中のTGPランニングバッファーの中に1:2,500に希釈したストレプトアビシンアルカリホスファターゼコンジュゲートと10分接触させ、次いで洗い、そして実施例1に記載の通りに目視した。

アッセイ4。

第四アッセイにおいては、プライマーをPCR反応混合物から、化合物に結合した相補性オリゴヌクレオチド配列に対するこのプライマーのハイブリダイゼーションによってCDCAの前に除去した。各PCR増幅サイクル数のグループのプライマーを、捕捉すべきプライマーの配列に相補性の配列を有するオリゴヌクレオチドでコートされたビーズと接触させることによって捕捉した。

a) 捕捉系の用意。ストレプトアビシンをWoodward, R. B. 及びElofson, R. A. (1961) J. Amer. Chem. Soc. 83, 1007-1010の原理に従い、イスラエル特許出願098452号に記載の条件のもとで(その開示内容は引用することで本明細書に組入れる)スチレン/ビニルカルボン酸ビーズ(直径5  $\mu$ m, Bangs Laboratories, Inc. Carmel, IN, USAより市販)に結合させた。相補性オリゴヌクレオチド配列 5'-TATTCCCTAATTGAACTTCAAを合成し、そして実施例1に記載の通りにビオチニル化した。

オリゴヌクレオチドを下記の手順によりビーズに結合させた。

100  $\mu$ l の1%のコート化ビーズを1 mg/mlのビオチニル化オリゴ

ヌクレオチドの溶液と1:1で混合した。この溶液を30°Cで3時間インキュベートした。未結合のオリゴヌクレオチドをPBSの中で洗い、そしてPBS中の1%のゼラチン溶液の中で保存した。

b) アッセイ手順。3  $\mu$ l の各PCR増幅サイクル数グループを、0.50%の相補性オリゴヌクレオチドコート化ビーズ及びTGPバッファー中のストレプトアビシンアルカリホスファターゼコンジュゲート(1:500に希釈)を含む溶液30  $\mu$ l を含んでいるウェルに加え、そして10分間インキュベートした。

実施例1の通りに用意した、吸収部位がブロックされているニトロセルロースストリップを含むストリップ22の接触部分20を次に、インキュベート溶液と10分間接触させた。このストリップ22を次に洗い、そして実施例3の通りにシグナルを発生させた。

表2はCDCAの感度に及ぼす増幅後のプライマーの排除の効果を示す。

系	アッセイ1-4の検出限界						
	0	2	4	6	8	10	20
アッセイ1						+	+
アッセイ2	+	+	+	+	+	+	+
アッセイ3	+	+	+	+	+	+	+
アッセイ4		+	+	+	+	+	+

+= HIV DNA配列の検出。

表2からわかる通り、未処理PCR溶液は8サイクルの増幅の後でさえもCDCAアッセイにおいて可視シグナルを提供しなかった。10サ

## 特表平7-501933 (12)

イクルくらい経た後のみに、陽性応答が認められた。分離段階又は検査による増幅後のプライマーの排除は2～6PCRサイクルのみの後に標的核酸配列の検出を可能にした。各技術によるプライマーの排除はゲル電気泳動及びEtBrによる識別化によって確認した(データーは示していない)。

### 実施例5

#### 溶液中でのハイブリダイゼーションによる臨床サンプル中のHPV配列の検出

プローブの用意。一本鎖HPV配列を、実施例3に記載のHPVプライマー-h1を利用する非対称性PCR増幅によって調製した。増幅のために下記の条件を利用した。実施例3に記載の通りに調製した10ngの非ラベルHPV PCR生成物を模型として用い、そしてただ一つのプライマー-h1を増幅のために用いた。実施例3に記載の通りにして50PCRサイクルを実施した。

次にその一本鎖生成物を30°Cで1時間スルホン化し、次いでChemiprobe(商標)キット(Organics, Ltd.)の使用のための仕様書に記載の通りにSephadex G-50を用いることによって脱塩した。

#### HPV配列の増幅

HPV配列を2通りの方法によって臨床サンプルから増幅させた: A) ビオチニル化h2プライマー及び非ラベルh1プライマーを使用、並びにB) ビオチニル化h2プライマー及びスルホン化h1プライマーを使用。両方の方法に関し、PCRは実施例3に記載の通りにして、35サイクル行った。

#### ハイブリダイゼーション

方法AのPCR反応混合溶液5μl(35サイクル後)を、0.66MのNaCl、65mMのクエン酸ナトリウム、0.3MのEDTA、0.1Mのリン酸バッファーpH6.6、0.02%のフィコール(商標)、0.2%のポリビ

ニルピロリドン、0.5%のポリエチレンギコール、0.12%の牛血清アルブミン及び100ngの上記のスルホン化プローブを含むハイブリダイゼーション溶液95μlに加えた。この溶液を95°Cで5分熱し、次いで急冷した。ハイブリダイゼーションを65°Cで45分間行った。

#### CDCAによる捕獲

ハイブリダイゼーション完了後の3μlのハイブリダイゼーション混合物又は方法B由来の0.3μlのPCR反応混合溶液を、TGPランニングバッファー中のストレプトアビジンアルカリホスファターゼ30μlを含むウェルに加えた。実施例1に記載の通りに用意したニトロセルロースストリップを含むストリップ22の接触部分20をこのウェル中の溶液と10分接触させ、ハイブリドを捕獲し、そして実施例3の通りに目視した。

#### 結果

12サンプルを評価した。試験した両方の方法に関して、同一の5つのサンプルは陽性であり、そして同一の7つのサンプルは陰性であった。

### 実施例6

#### 発色剤としての着色ラテックスビーズを用いるCDCA系におけるHPVの検出

ストレプトアビジン(Sigma)を0.2μmのスチレン/ビニルカルボン酸着色化ビーズ(Bangs Laboratories Inc., Carmel, IN, USA)に共有結合させた。この結合は実施例4に記載の通りWoodwardらの方法によって達成せしめた。

HPV配列を含むと予測される臨床サンプル由来のPCR生成物を、実施例3に記載の通りにh-1スルホン化及びh-2ビオチニル化プライマーを用いて第二PCR増幅工程によって増幅させた。実施例1に記載の通りにPEG溶液を利用してPCR反応混合溶液からプライ

マーを排除した。この溶液3μlを1.0%のゼラチン、0.3%のツイーン20及び0.25MのNaCl中の0.05%のストレプトアビジン結合化ビーズを含むウェルに加えた。実施例3に記載の通りに調製したストリップ22の接触部分20をウェルの中に、このウェル中の溶液を接触するようにして入れた。数分後、青色のシグナルがストリップ22の捕獲ゾーン32において識別された。

### 実施例7

#### 捕獲試薬としてDNAを利用するキャビラリーDNA濃縮アッセイにおけるHPV配列の検出

##### a) プライマーの選択

HPV/16のE6遺伝子におけるプライマーを選び、そして下記の配列を有する:

###### プライマー 1

5' AAGGGCGTAACCGAAATCGGT

###### プライマー 2

5' GTTGTTCAGCTCTGTGC

##### b) オリゴヌクレオチドプローブ捕獲試薬

捕獲試薬として働くオリゴヌクレオチドプローブを、PCR反応におけるプライマー2の伸長により生成されるビオチニル化鎖の配列と相補性となるように選んだ。下記の配列を選んだ:

CAACAACAACAAGTTCAAGGACCCACAGGAGCGACCC

##### c) ニトロセルロース支持ストリップの用意

孔径5ミクロンのマイレッドニトロセルロース(Micron Separation Inc., Westboro, MA, USA)を0.5×3.0cmのストリップに切った。10XのSSC(SSCは0.15MのNaCl及び0.015Mのクエン酸ナトリウム、pH7.0より成る)中の5ngのオリゴヌクレオチドプローブ捕獲試薬より成る溶液1μlを、各ニトロセルロースストッ

プの中央にスポットを形成するように適用した。次にこれらのストリップを37°Cで15分間乾かし、次いでオリゴヌクレオチドプローブを、これらのストリップを5分間のUV照射に暴露することによってニトロセルロースストリップに固定させた。

##### d) HPV配列の増幅

PCR増幅は、1μgの正常ヒト胎盤DNAの存在下で1,000, 100, 10, 1又は0pgのCasKi細胞DNAのいづれかを含む100μlのアリコートの反応混合物の中で実施した。各PCR反応混合物は更に100pmoleの各プライマー(P1及びP2)、0.25mMの4種類のデオキシヌクレオチド三リン酸、10μlの10XのTaqバッファー及び2.5UのTaq DNAポリメラーゼを含んだ。

94°Cで5分の第一DNA変性段階に続き、94°Cで1分の変性、47°Cで1.5分のアニーリング及び72°Cで1.5分の伸長、30サイクルを行った。増幅は72°Cで7分の伸長で終えた。

##### e) DNAの輸送及び濃縮

標的核酸配列の濃縮及び捕獲は下記のクロマトグラフィーハイブリダイゼーション手順により達成せしめた:

上記の段階dにおいて獲得した50μlづつのPCR生成物を、0.6MのNaCl、20mMのリン酸バッファー、pH7.5、0.02%のフィコール400(Sigma, St. Louis, MO, USA)、0.02%のゼラチン及び1%のPVPより成る450μlのハイブリダイゼーション溶液の中に1:10に希釈した。これらのサンプルを10分間煮沸し、そして氷上で急冷した。200μlづつの溶液を次に図1～4に示す装置12のウェル14に移し、そして各ストリップ22の接触部分20をウェル14中の溶液と接触させた。

装置12を37°Cの多湿インキュベーター(相対湿度90%)の中に25分間入れ、次いでその溶液を、吸水性担体24を構成しているニトロ

セルロースストリップ伝いに泳動させた。これらのストリップを次に、PBS の中に 1 : 2,500 に希釈された  $100 \mu\text{l}$  のストレプトアビシンアルカリホスファターゼコンジュゲート及び 0.3 % のツイーン 20 を含むウェル 16 の中に 20 分間入れておいた。これらのストリップを次に  $150 \mu\text{l}$  の PBS 及び 0.3 % のツイーン 20 を含む溶液を含んでいるウェルに移した。ストリップ 22 の接触部分 20 をこの溶液に  $37^\circ\text{C}$  で 15 分接触させておいた。最後にこれらのストリップを、発色反応のための基質を供する ChemiProbe (商標) BCIP/NBT 溶液の中に  $37^\circ\text{C}$  で 20 分浸しておいた。ストリップ 22 の捕獲ゾーン 32 における青色のシグナルは HPV DNA の存在を示す。

1 pg の Caski DNA ほどの低い量で存在している HPV 配列がこのクロマトグラフィーハイブリダイゼーション手順によって検出できることが見い出された。

本発明は本明細書において特定に示した及び記載したものに限定されないことが当業者にとって明らかであろう。本発明の範囲は下記の請求の範囲によってのみ限定される。

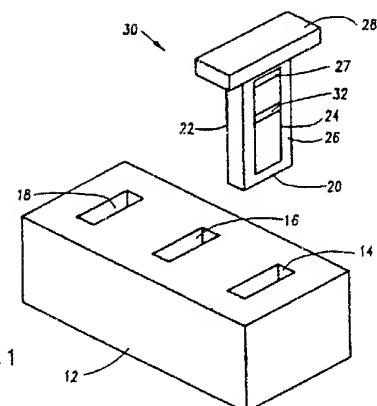


FIG.1

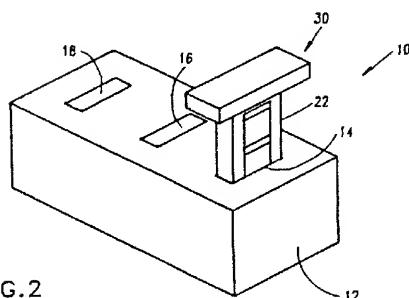


FIG.2

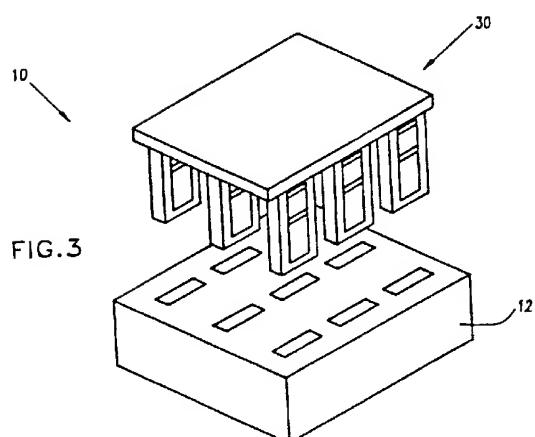


FIG.3

補正書の翻訳文提出書  
(特許法第184条の8)

平成 6 年 4 月 4 日

特許庁長官 麻生 波殿

1 特許出願の表示  
PCT/NL92/00176

2 発明の名称  
核酸配列の検出のための方法及び装置  
3 特許出願人

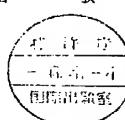
住 所 イスラエル国、ヤブネ 70650、インダストリアル  
ゾーン(番地なし)、ピー、オー、ボックス 360  
名 称 オーゲニクス リミティド

4 代 理 人  
住 所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目 8 番 10 号  
静光虎ノ門ビル 静和特許法律事務所  
電話 (3504)0721

氏 名 弁理士 (7751) 石 田 敏

5 補正書の提出年月日  
1993年5月3日

6 添付書類の目録  
補正書の翻訳文



1 通

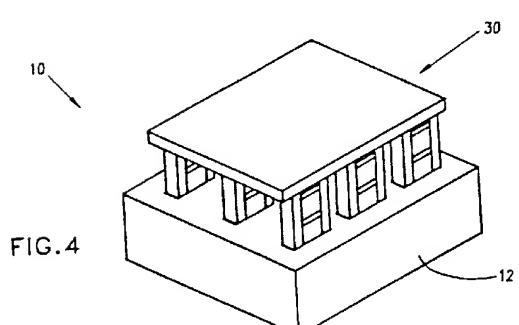


FIG.4

## 請求の範囲

1. ブロックされていない吸水性担体内で核酸配列を含む分子を輸送するための装置であって、該分子を含む溶液と接触しているときに、該分子の輸送を補助するキャビラリー輸送経路を規定するブロックされていない乾燥吸水性担体を含んで成る装置。

2. 液体サンプル中の標的分子の濃縮のための装置であって：

ブロックされていない乾燥吸水性担体（ここで、この標的分子は標的核酸配列を含み、そして前記ブロックされていない吸水性担体内で、キャビラリー作用により、このブロックされていない乾燥吸水性担体がこの標的分子を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）；及び

前記ブロックされていない吸水性担体の接触部分の下流にあるこのブロックされていない乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一捕獲試薬（ここで、この少なくとも一捕獲試薬は標的分子を捕獲することができる）；

を含んで成る請求項1に記載の装置。

3. 標的核酸配列を含む標的分子の、この標的分子と、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド並びにブロッキング剤とを含む液体サンプル中の非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドからの分離のための装置であって：

前記非標的オリゴヌクレオチドに結合する化合物を含む槽；及び  
キャビラリー作用により前記槽から前記標的分子をブロックされていない乾燥吸水性担体に含まれている輸送経路伝いに輸送するための手段；

を含んで成る装置。

4. 前記ブロックされていない吸水性担体がニトロセルロース膜

14. 前記リガンドが抗原性エピトープを含んで成る、請求項13に記載の装置。

15. 前記リガンドが少なくともースルホン化シトシンを含んで成る、請求項14に記載の装置。

16. 前記非標的オリゴヌクレオチドが、前記標的核酸配列に一体化されていないオリゴヌクレオチドプライマーを含んで成る、請求項3に記載の装置。

17. 前記化合物が、輸送のための前記手段によって輸送されるのには大きすぎるゲル通過粒子を含んで成る請求項3に記載の装置。

18. 前記化合物が、輸送のための前記手段によって輸送されないマトリックスを占めており、そしてここで前記化合物が前記非標的オリゴヌクレオチドとハイブリダイズする、請求項3に記載の装置。

19. 吸水性担体の中で増幅標的核酸配列の濃縮のための装置（ここで、この標的核酸配列はこの吸水性担体の中での標的核酸配列の濃縮を助長するサイズとなっている）であって：

この増幅標的核酸配列の輸送を補助するキャビラリー輸送経路を規定する吸水性担体；及び

少なくとも30～500 塩基数の核酸配列の増幅領域を含む標的核酸配列；

を含んで成る装置。

20. 核酸配列を含む標的分子の濃縮のための装置であって、核酸配列を含む捕獲試薬が吸水性担体上に、高塩溶液及び紫外線照射への暴露によって固定化されている、装置。

21. 増幅標的核酸配列を含む増幅標的分子の濃縮のための装置であって、吸水性担体上に固定化された核酸配列を含む核酸捕獲試薬を含んで成り、ここでこの核酸配列が、この増幅標的核酸配列の少なくとも一部に相補性な核酸プローブを含み、そしてここでこの核

## 特表平7-501933 (14)

である、請求項2に記載の装置。

5. 前記ブロックされていない吸水性担体がガラスファイバー膜である、請求項2に記載の装置。

6. 前記ブロックされていない乾燥吸水性担体伝いの液体のキャビラリー輸送を助長するために、このブロックされていない吸水性担体に、前記少なくとも一捕獲ゾーンの下流にて吸収パッドが固定されている、請求項2に記載の装置。

7. 前記ブロッキング剤が、巨大分子、清浄剤及びそれらの組合せを含んで成る群から選ばれる化合物である、請求項2に記載の装置。

8. 前記少なくとも一捕獲試薬が、前記標的核酸配列の改質部分に対する抗体を含んで成る、請求項2に記載の装置。

9. 前記少なくとも一捕獲試薬が、前記標的核酸配列の少なくとも一部に相補性な核酸プローブ配列を含む少なくとも一核酸捕獲試薬を含んで成る、請求項2に記載の装置。

10. 核酸配列を含む前記標的分子が、酵素増幅反応の核酸生成物を含んで成り、そして少なくとも一对のオリゴヌクレオチドプライマーを一体化せしめている、請求項2に記載の装置。

11. 前記少なくとも一对のプライマーがポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のためのプライマーを含んで成る、請求項10に記載の装置。

12. 前記少なくとも一对のプライマーがリガーゼ連鎖反応（LCR）のためのプライマーを含んで成る、請求項11に記載の装置。

13. 前記少なくとも一对のプライマーのうちの少なくとも第二プライマーが、少なくとも一捕獲試薬に結合するリガンドを抱えるオリゴヌクレオチドを含み、これにより、前記リガンドを抱える前記少なくとも一プライマーを含む前記標的分子が前記少なくとも一捕獲試薬に結合しうる、請求項10に記載の装置。

酸プローブが、ラベル化増幅配列において、プライマーの相補性配列から少なくとも5塩基離れている、装置。

22. ブロックされていない吸水性担体内での核酸配列を含む分子の輸送のための方法であって：

核酸配列を含む分子の輸送を補助するキャビラリー輸送経路を規定するブロックされていない乾燥吸水性担体を用意し；そして  
この乾燥吸水性担体を核酸配列を含む分子及びブロック剤を含んでいる溶液と接触させること；  
の段階を含んで成る方法。

23. 液体サンプル中の、核酸配列を含む分子の濃縮のための方法であって：

ブロックされていない乾燥吸水性担体を用意し（ここで、前記分子は、標的核酸配列を含む標的分子であり、そしてここで、前記分子は、このブロックされていない吸水性担体内で、キャビラリー作用により、このブロックされていない乾燥吸水性担体の一部がこの分子を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）；  
前記乾燥吸水性担体の一部を、前記標的分子を含む液体サンプル及びブロッキング剤と接触させ（ここでこのブロックされていない乾燥吸水性担体は、ブロッキング剤を含む溶液で満れているとき、核酸配列を含む分子の輸送を補助する液輸送経路を規定する）；  
前記液輸送経路伝いに前記標的分子を輸送し；そして

前記分子を、前記ブロックされていない吸水性担体の前記液体と接触している部分の下流にあるこのブロックされていない乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一捕獲試薬により捕獲すること；  
の段階を含んで成る方法。

クレオチド及びオリゴヌクレオチドを含む液体サンプル中の非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドからの分離のための方法であって：

前記非標的オリゴヌクレオチドに結合する化合物を含む槽を用意し：

前記標的分子と、前記非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド並びにブロッキング剤を含む液体サンプルを加え；そして前記分子をキャビラリー作用により輸送すること；  
の段階を含んで成る方法。

25. 標的核酸配列を含む標的分子の、この標的分子と、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド並びにブロッキング剤を含む液体サンプル中の非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドからの分離、この標的分子の濃縮、並びに濃縮標的分子の検出のための装置であって：

前記非標的オリゴヌクレオチドに結合する化合物を含む複数ウェルの第一領域を含む複数のウェルを規定する機器（ここで前記液体サンプルをこの複数のウェルの第一領域に加えることができる）；

ブロッキング剤を含む溶液で満れているときに前記標的分子の輸送を補助する、前記槽からの液輸送経路を規定するブロックされていない乾燥吸水性担体（ここで前記標的分子はこのブロックされていない吸水性担体内で、キャビラリー作用により、このブロックされていない乾燥吸水性担体の接触部分がこの標的分子及びブロッキング剤を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）；

前記標的分子を捕獲できる少なくとも一捕獲試薬（ここでこの少なくとも一捕獲試薬は、このブロックされていない吸水性担体の接触部分の下流にあるこのブロックされていない乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている）；並びに

及びブロッキング剤を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）；

ハイブリダイゼーションによって前記標的核酸配列を捕獲するための核酸プローブ配列を含む少なくとも一核酸捕獲試薬（ここで、この少なくとも一核酸捕獲試薬はこのブロックされていない吸水性担体の接触部分の下流にあるこのブロックされていない乾燥吸水性担体上の捕獲ゾーンにおいて固定化されている）；及び

前記の捕獲された標的核酸配列を検出するための手段；  
を含んで成る装置。

28. 吸水性担体の中で增幅標的核酸配列を濃縮するための方法（ここで、この標的核酸配列はこの吸水性担体の中での標的核酸配列の濃縮を助長するサイズとなっている）であって：

この増幅標的核酸配列の輸送を補助するキャビラリー輸送経路を規定する吸水性担体を用意し；そして

少なくとも30～500 塩基数の核酸配列を供するようにこの標的核酸配列の少なくとも一部を増幅させること；

を含んで成る方法。

29. 核酸配列を含む標的分子の濃縮のための方法であって、核酸配列を含む捕獲試薬を吸水性担体上に、高塩溶液及び紫外外照射への曝露によって固定化させる段階を含んで成る方法。

30. 増幅標的核酸配列を含む増幅標的分子の濃縮のための方法であって、吸水性担体上に核酸配列を含む核酸捕獲試薬を固定化する段階を含んで成り、ここでこの核酸配列が、この増幅標的核酸配列の少なくとも一部に相補性な核酸プローブを含み、そしてここでこの核酸プローブが、ラベル化増幅配列において、プライマーの相補性配列から少なくとも5 塩基離れている、方法。

31. 液体サンプル中の、核酸配列を含む分子の濃縮のための方法

この捕獲標的分子を検出するための手段；

を含んで成る装置。

26. 液体サンプル中の標的核酸配列の濃縮及び検出のための方法であって：

ブロックされていない乾燥吸水性担体を用意し（ここで、この標的核酸配列はこのブロックされていない乾燥担体内で、キャビラリー作用により、このブロックされていない乾燥吸水性担体の一部がこの標的核酸配列及びブロッキング剤を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）；

前記ブロックされていない乾燥吸水性担体の一部を、前記標的核酸配列及びブロッキング剤を含む液体サンプルと接触させ（ここで、この吸水性担体は、ブロッキング剤を含む溶液で満れているとき、この標的核酸配列の輸送を補助する液輸送経路を規定する）；

前記標的核酸配列を前記液輸送経路伝いに輸送し；

前記標的核酸配列を、前記液体サンプルと接触しているこのブロックされていない吸水性担体の部分の下流にあるこのブロックされていない乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一核酸捕獲試薬とのハイブリダイゼーションにより捕獲すること；

の段階を含んで成る方法。

27. 標的核酸配列の濃縮及び検出のための装置であって：複数のウェルを規定する機器；

ブロッキング剤を含む溶液で満れているときに前記標的核酸配列の輸送を補助する、前記槽からの液輸送経路を規定するブロックされていない乾燥吸水性担体（ここでこの標的核酸配列はこのブロックされていない吸水性担体内で、キャビラリー作用により、このブロックされていない乾燥吸水性担体の接触部分がこの標的核酸配列

であって：

乾燥吸水性担体（ここで、前記分子は、標的核酸配列を含む標的分子であり、そしてここで、前記分子は、コントロールされた速度でこの吸水性担体内で、キャビラリー作用により、この乾燥吸水性担体の一部がこの分子及びブロッキング剤を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）及びこの吸水性担体中の標的分子の輸送速度をコントロールする手段を用意する；

前記乾燥吸水性担体の一部を、前記標的分子を含む液体サンプルと接触させ（ここでこの乾燥吸水性担体は、満れているとき、核酸配列を含む分子の輸送を補助する液輸送経路を規定する）；

前記液輸送経路伝いにコントロールされた速度で前記標的分子を輸送し；そして

前記分子を、ブロックされていない吸水性担体の前記液体と接触している部分の下流にあるこのブロックされていない乾燥吸水性担体上の少なくとも一捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一捕獲試薬により捕獲すること；

の段階を含んで成る方法。

32. コントロールのための前記手段がポリビニルピロリドン及びグリセロールを含んで成る群から選ばれる化合物を含んで成る、請求項31に記載の方法。

33. 検出のための前記手段が：

シグナル生成試薬に結合するリガンドを抱える、核酸配列を含む標的分子がその上に固定化されている吸水性担体；及び

この核酸配列を含む標的分子の検出を指標する検出可能シグナルを生成するため、前記リガンドを抱える核酸配列を含む標的分子を前記シグナル生成試薬と接触させるための手段；

を含んで成る、請求項25に記載の装置。

34. 前記標的核酸配列が酵素増幅反応の生成物であり、そして少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーを一体化せしめている、請求項33に記載の装置。

35. 前記非標的オリゴヌクレオチドが、前記標的核酸配列に一体化されていないオリゴヌクレオチドプライマーを含んで成る、請求項25に記載の装置。

36. 前記少なくとも一対のプライマーがポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)のためのプライマーを含んで成る、請求項34に記載の装置。

37. 前記一対のプライマーが、リガーゼ連鎖反応 (LCR)のためのプライマーを含んで成る、請求項34に記載の装置。

38. 前記少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーのうちの第二プライマーが、前記少なくとも一捕獲試薬に結合するリガンドを含み、これにより、このリガンドを含む前記標的分子がこの少なくとも一捕獲試薬に結合しうる、請求項34に記載の装置。

39. 前記リガンドが抗原性エピトープを含んで成る、請求項38に記載の装置。

40. 前記リガンドが少なくともースルホン化シトシンを含んで成る、請求項39に記載の装置。

41. 前記少なくとも一対のプライマーのうちの第一プライマーがシグナル生成試薬に結合するリガンドを含み、これにより、このリガンドを含む前記標的分子が、このシグナル生成試薬により生成されるシグナルの存在により検出されうる、請求項34に記載の装置。

42. 前記リガンドを含む前記標的分子がシグナル発生剤との接触後のシグナル生成試薬により生成されるシグナルの存在により検出されうる、請求項41に記載の装置。

43. 前記リガンドがビオチニル化ヌクレオチドを含んで成る、請求項41に記載の装置。

44. 前記シグナル生成試薬により生成されるシグナルが、粒子に結合したストレプトアビジンを含んで成る、請求項41に記載の方法。

45. 前記シグナル発生剤との接触後に前記シグナル生成試薬により生成されるシグナルがストレプトアビジンーアルカリホスファターゼコンジュゲートを含む、請求項42に記載の装置。

46. 前記増幅標的核酸配列が、酵素増幅反応の生成物であり、そして少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーを一体化せしめている、請求項19に記載の装置。

47. 前記少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーがポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)のためのプライマーを含んで成る、請求項46に記載の装置。

48. 前記少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーがリガーゼ連鎖反応 (LCR)のためのプライマーを含んで成る、請求項46に記載の装置。

49. 前記した第一領域ウェルがシグナル生成試薬も含む、請求項25に記載の装置。

50. 前記複数のウェルが、洗浄溶液を含む第二領域ウェルを更に含む、請求項25に記載の装置。

51. 前記複数のウェルが、シグナル発生剤溶液を含む第三領域ウェルも含む、請求項25に記載の装置。

52. 前記複数のウェルが、標的核酸配列について検査すべきサンプルを含む第一領域ウェルを含んで成る、請求項27に記載の装置。

53. 前記複数のウェルが、シグナル生成試薬を含む第二領域ウェルを更に含んで成る、請求項27に記載の装置。

54. 前記複数のウェルが、洗浄溶液を含む第三領域ウェルを更に含んで成る、請求項27に記載の装置。

55. 前記複数のウェルが、シグナル発生剤を含む第四領域ウェル

を更に含んで成る、請求項27に記載の装置。

56. 前記乾燥吸水性担体が少なくとも一本のストリップを含んで成る、請求項25に記載の装置。

57. 前記第一領域ウェルのそれぞれが、前記標的分子をそれらが捕獲される前記少なくとも一捕獲ゾーンに至るまで輸送するために、各ストリップの接触部分を受け入れるようになっている、請求項56に記載の装置。

58. 前記第二領域ウェルのそれぞれが、前記少なくとも一捕獲ゾーンにおける前記標的分子の固定化の後の非特異的に捕獲された化合物の除去のために、前記ストリップを洗浄するために各ストリップの接触部分を受容するようになっている、請求項50に記載の装置。

59. 前記第三領域ウェルのそれぞれが、ストリップ全体を受容するようになっている、請求項51に記載の装置。

60. 接触のための前記手段が：

シグナル生成試薬溶液を含む少なくとも一第三領域ウェル；  
前記少なくとも一捕獲ゾーンにおける前記標的分子の固定化を経た少なくともーストリップ（ここでこのストリップ全体がシグナル発生剤溶液と、このシグナル発生剤とこの少なくとも一捕獲ゾーンとの接触を可能とするように接触している）；  
を含んで成る請求項59に記載の装置。

61. 前記第一領域ウェルのそれぞれが、前記核酸配列を、少なくとも一捕獲ゾーンに至るまで輸送するよう各ストリップの接触部分を受容するようになっている、請求項28に記載の装置。

62. 前記第二領域ウェルのそれぞれが、前記シグナル生成試薬を、それが前記標的核酸配列に抱えられたりガンドに結合しうる前記少なくとも一捕獲ゾーンに至るまで輸送するよう、各ストリップの接触部分を受容するようになっている、請求項53に記載の装置。

63. 前記第三領域ウェルのそれぞれが、前記ストリップ一捕獲ゾーンにおける前記標的核酸配列の固定化の後の非特異的に捕獲された化合物の除去のために、前記ストリップを洗浄するために各ストリップの接触部分を受容するようになっている、請求項54に記載の装置。

64. 検出のための前記手段が：

シグナル発生剤を含む少なくとも一第四領域ウェル；

前記少なくとも一捕獲ゾーンにおける前記標的核酸配列の固定化及び接触ゾーンのシグナル生成試薬への暴露を経た少なくともーストリップ（ここでこのストリップ全体がシグナル発生剤溶液と、このシグナル発生剤とこの少なくとも一捕獲ゾーンとの接触を可能とするよう接觸している）；  
を含んで成る請求項55に記載の装置。

65. 前記第四領域ウェルがストリップ全体を受容するようになっている、請求項64に記載の装置。

66. 特異的な核酸配列の検出のための方法であって：

オリジナルの核酸配列の少なくとも一部に特異的である30～500塩基の核酸配列を含む標的分子を生成するために、このオリジナル核酸配列の少なくとも一部を酵素反応によって増幅し；

この標的分子を、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドから分離し（ここで、この分離は：

非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドに結合する基体を含む槽を用意し；

前記標的分子と、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド並びにブロッキング剤及び輸送速度コントロール化合物とを含む液体サンプルを加え；そして

この標的分子、ブロッキング剤及び輸送速度コントロール剤をキ

キャビラリー作用によって輸送する；段階を含む）；

この標的分子を濃縮し（ここで、この濃縮は：

プロックされていない乾燥吸水性担体を用意する（ここで、この標的分子はこのプロックされていない吸水性担体内で、キャビラリー作用により、コントロールされた速度で、この乾燥吸水性担体の一部がこの標的分子プロッキング剤及び輸送速度コントロール化合物を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）；

このプロックされていない乾燥吸水性担体の一部を、この標的分子、プロッキング剤及び輸送速度コントロール化合物を含む液体サンプルと接触させる（ここで、この乾燥吸水性担体は、プロッキング剤及び輸送速度コントロール化合物を含む液体で濡れているとき、この標的分子の輸送を補助する輸送速度のコントロールされた液輸送経路を規定する）；

この標的分子をこの液輸送経路伝いにコントロールされた速度で輸送し；そして

この標的分子を、この液体サンプルを接触しているプロックされていない吸水性担体の部分の下流にあるこのプロックされていない乾燥吸水性担体上の捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一捕獲試薬により捕獲する；段階を含む）；次いで

この標的分子を検出する（この検出は：

シグナル生成試薬に結合するリガンドを含む標的分子を用意し；そして

リガンドを有し、且つ捕獲ゾーンにおいて捕獲されている標的分子をシグナル発生剤と接触させて検出可能シグナルを生成する；段階を含む）；段階を含んで成る方法。

67. 特異的な核酸配列の検出のための方法であって：

オリジナルの核酸配列の少なくとも一部に特異的である30～500

塩基の核酸配列を生成するために、このオリジナルの核酸配列の少なくとも一部を酵素反応によって増幅し；

この標的核酸配列非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド、プロッキング剤及び輸送速度コントロール化合物を含む液体サンプルを用意し；

標的分子、プロッキング剤及び輸送速度コントロール化合物をキャビラリー作用によって輸送し；

この標的分子を濃縮し（ここで、この濃縮は：

プロックされていない乾燥吸水性担体を用意し（ここで、この標的分子はこのプロックされていない吸水性担体内で、キャビラリー作用により、コントロールされた速度で、この乾燥吸水性担体の一部がこの標的分子、プロッキング剤及び輸送速度コントロール化合物を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）；

このプロックされていない乾燥吸水性担体の一部を、この標的分子、プロッキング剤及び輸送速度コントロール化合物を含む液体サンプルと接触させ（ここで、このプロックされていない乾燥吸水性担体は、プロッキング剤及び輸送速度コントロール化合物を含む液体で濡れているとき、この標的分子の輸送を補助する輸送速度のコントロールされた液輸送経路を規定する）；

この標的分子をこの液輸送経路伝いにコントロールされた速度で輸送し；そして

この標的分子を、この液体サンプルを接触しているプロックされていない吸水性担体の部分の下流にあるこのプロックされていない乾燥吸水性担体上の捕獲ゾーンにおいて固定化されている少なくとも一捕獲試薬により捕獲する；段階を含む）；次いで

この標的分子を検出する（この検出は：

シグナル生成試薬に結合するリガンドを含む標的分子を用意し；

そして

リガンドを有し、且つ捕獲ゾーンにおいて捕獲されている標的分子をシグナル発生剤と接触させて検出可能シグナルを生成する；段階を含む）；段階を含んで成る方法。

68. 特異的な増幅核酸配列の検出のための方法であって：

この標的分子、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド、プロッキング剤及び輸送速度コントロール化合物を含む液体サンプルを用意し；

標的分子、プロッキング剤及び輸送速度コントロール化合物をキャビラリー作用によって輸送し；

この標的分子を濃縮し（ここで、この濃縮は：

乾燥吸水性担体を用意し（ここで、この標的分子はこの乾燥吸水性担体内で、キャビラリー作用により、コントロールされた速度で、この乾燥吸水性担体の一部がこの標的分子及び輸送速度コントロール化合物を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）；

この乾燥吸水性担体の一部を、この標的分子及び輸送速度コントロール化合物を含む液体サンプルと接触させ（ここで、この乾燥吸水性担体は、輸送速度コントロール化合物を含む液体で濡れているとき、この標的分子の輸送を補助する輸送速度のコントロールされた液輸送経路を規定する）；

この標的分子をこの液輸送経路伝いにコントロールされた速度で輸送し；そして

この標的分子を、この液体サンプルと接触している吸水性担体の部分の下流にあるこの乾燥吸水性担体上の捕獲ゾーンにおいて固定化去れている少なくとも一捕獲試薬により捕獲する；段階を含む）；次いで

この標的分子を検出する（この検出は：

シグナル生成試薬に結合するリガンドを含む標的分子を用意し；そして

リガンドを有し、且つ捕獲ゾーンにおいて捕獲されている標的分子をシグナル発生剤と接触させて検出可能シグナルを生成する；段階を含む）；段階を含んで成る方法。

69. 特異的な増幅核酸配列の検出のための装置であって：

標的分子、非標的ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド、並びに輸送速度コントロール化合物を含む液体サンプル；

乾燥吸水性担体（ここで、この標的分子は乾燥吸水性担体内で、キャビラリー作用により、コントロールされた速度で、この乾燥吸水性担体の接触部分が標的分子及び輸送速度コントロール化合物を含む液体サンプルと接触しているときに輸送される）；

この液体サンプルを接触しているこの吸水性担体の部分の下流にある、この輸送吸水性担体上の捕獲ゾーンにおいて高塩及び紫外照射により固定されている少なくとも一核酸捕獲試薬を含む、標的分子を捕獲するための手段；並びに

この捕獲された標的分子を検出するための手段；を含んで成る装置。

国際調査報告

International Application No. PCT/HL 92/00176

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (In which classification symbols apply, indicate all) According to International Patent Classification (IPC) or its National Classification and IPC			
Int.Cl. 5 C12Q1/68; GOIM33/558; GOIM33/543; // C12Q1/70			
II. FIELDS SEARCHED			
International Classification Searched <sup>1</sup>			
Classification System		Classification System	
Int.Cl. 5	C12Q ; GOIM		
Classification Searched other than International Classification in the Case that such Differences are Located in the Fields Searched <sup>2</sup>			
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category <sup>3</sup>		Character of Document <sup>4</sup> (In which classification symbols apply, indicate all) Indication of Date of Document, etc. (where appropriate, of the relevant passage) Reference to Date of Document	
X	EP, A, 0 262 328 (ABBOTT LABORATORIES) 6 April 1988 see page 9, line 1 - page 15, line 52 see page 28, line 35 - line 47 see page 32, line 10 - page 33, line 52 see page 41, line 20 - page 42, line 50; claims -----	1-5, 23-25, 27,49,50	
X	EP, A, 0 306 336 (SYNTEX (USA) INC.) 8 March 1989 see page 5, line 2 - line 19 see page 7, line 56 - page 8, line 18 see page 11, line 50 - page 12, line 39 see page 19, line 60 - page 21, line 61; claims -----	1 -----	
<small>           * Special category of cited documents: 1) documents relating to the potential uses of the art which is not considered to be of particular interest            2) documents not published or not filed after the International Filing Date            3) documents which may derive directly from priority documents or from documents which are not patentable (e.g. documents which are not patentable, documents which are not new, documents which are not inventive, documents which are not complete, documents which are not clear, documents which are not sufficiently disclosed)            4) documents not published prior to the International Filing Date but which may be of interest            5) documents which are not patentable, documents which are not new, documents which are not inventive, documents which are not complete, documents which are not clear, documents which are not sufficiently disclosed         </small>			
IV. CERTIFICATION		Date of the Actual Completion of the International Search 15 JANUARY 1993	
International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE		Date of Mailing of PCT International Search Report 26.1.93	
Signature of International Searching Authority LUZZATTO E.R.			

Form PCT/ISA/29 (1st edition 1989)

II. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category	Character of Document, etc. (where appropriate, of the relevant passage)	Reference to Date of Document
A	WO,A,8 910 979 (E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY) 16 November 1989 see page 7, line 15 - page 16, line 16; claims -----	2,14,17
A	EP,A,0 318 255 (EASTMAN KODAK COMPANY) 31 May 1988 see the whole document -----	29-32,60
A	WO,A,9 106 659 (PBS-ORGENICS) 16 May 1991 see the whole document -----	18,19, 26,36
A	EP,A,0 362 809 (BOEHRINGER BIOCHEMIA ROBIN S.P.A.) 11 April 1990 see the whole document -----	1-4
A	GB,A,2 191 577 (LANCE ALLEN LIOTTA) 16 December 1987 see the whole document -----	3,21,22

Form PCT/ISA/29 (1st edition 1989)

## 国際調査報告

HL 9200176  
SA 65378

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned International search report.  
The numbers are as contained in the European Patent Office EPO No. as  
The European Patent Office is in no way liable for those particulars which are merely given for the purpose of information. 15/01/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
EP-A-0262328	06-04-88	US-A- 4960691 AU-B- 598871 AU-A- 7903187 JP-A- 63096559	02-10-90 05-07-90 31-03-88 27-04-88
EP-A-0306336	08-03-89	US-A- 4981786 JP-A- 1072066	01-01-91 16-03-89
WO-A-8910979	16-11-89	EP-A- 0486547 JP-T- 3504199	17-07-91 19-09-91
EP-A-0318255	31-05-89	US-A- 4902624 EP-A, B 0318256 JP-A- 1266858 JP-A- 1168270	20-02-90 31-05-89 24-10-89 03-07-89
WO-A-9106659	16-05-91	EP-A- 0501950	09-09-92
EP-A-0362809	11-04-90	JP-A- 2136137 US-A- 5145789	24-05-90 08-09-92
GB-A-2191577	16-12-87	US-A- 4837145 AU-B- 504420 AU-A- 7345487 BE-A- 1001736 CA-A- 1293442 DE-A, C 3718621 FR-A- 2599845 JP-A- 63040859 LU-A- 86909 NL-A- 8701324 SE-B- 463894 SE-A- 8702334	06-06-89 06-12-90 10-12-87 20-02-90 24-12-91 10-12-87 11-12-87 22-02-89 11-11-87 04-01-88 04-02-91 10-12-87

For more details about this annex: see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

フロントページの続き

(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M  
C, NL, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI  
, CM, GA, GN, ML, MR, SN, TD, TG)  
, AT, AU, BB, BG, BR, CA, CH, CS,  
DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, K  
R, LK, LU, MG, MN, MW, NL, NO, PL  
, RO, RU, SD, SE, US

(72) 発明者 エルズベール, マクス  
イスラエル国, 73272, モシャブ サタリ  
ヤ (番地なし)